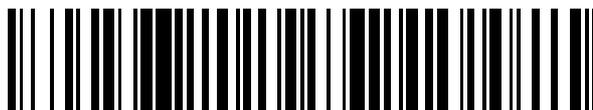


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 363**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

C07K 14/575 (2006.01)

A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2008 E 08803802 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.07.2015 EP 2190873**

54 Título: **Derivados truncados de GLP-1 y su uso terapéutico**

30 Prioridad:

05.09.2007 EP 07115743

28.01.2008 EP 08101010

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

06.11.2015

73 Titular/es:

NOVO NORDISK A/S (100.0%)

Novo Allé

2880 Bagsvaerd , DK

72 Inventor/es:

SPETZLER, JANE;

SCHÄFFER, LAUGE;

LAU, JESPER;

KODRA, JÁNOS TIBOR;

MADSEN, KJELD;

GARIBAY, PATRICK WILLIAM;

KOFOED, JACOB;

RUNGE, STEFFEN;

THØGERSEN, HENNING y

PETTERSSON, INGRID

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 550 363 T3

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

DESCRIPCIÓN

Derivados truncados de GLP-1 y su uso terapéutico

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de los péptidos terapéuticos, es decir a nuevos análogos truncados del péptido-1 semejante al glucagón (GLP-1) y sus derivados.

10 Antecedentes de la invención

Se han empleado una serie de métodos diferentes para modificar la estructura de los compuestos del péptido-1 semejante al glucagón (GLP-1) a efectos de dotarlos de una mayor duración de la acción *in vivo*.

15 Adelhorst et al. (1994) J. Biol. Chem. 269, 6275-6278, Knudsen et al. (2004) J. Med. Chem. 24, 4128-4134, WO 2006/097538, WO2006/097537, WO 2006/097536, WO2006/097535, WO 2006/037810, WO2006005667, WO 2005/027978, WO2003/011892, WO 98/08871 y US 2001/0011071 describen diversos análogos de GLP-1 y sus derivados.

20 Runge et al (Journal of Biological Chemistry, vol. 283, Nº 17, pp. 11340-11347), que se publicó después de las fechas de prioridad de la presente invención, dan a conocer la estructura cristalina del dominio extracelular del receptor de GLP-1 unido al ligando.

25 Muchos pacientes diabéticos, particularmente en el segmento de la diabetes tipo 2 están sujetos a la denominada "fobia a la aguja", es decir un temor muy fuerte a inyectarse a sí mismos. En el segmento de la diabetes tipo 2 la mayoría de los pacientes es tratada con hipoglucemiantes orales, y puesto que se espera que los compuestos de GLP-1 serán un producto farmacéutico inyectable para administrar a estos pacientes, el temor a las inyecciones puede convertirse en un serio obstáculo para el uso generalizado de compuestos clínicamente muy prometedores. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos compuestos que se puedan administrar menos de una vez al día, por ejemplo una vez cada dos o tres días, preferentemente una vez por semana, manteniendo simultáneamente un perfil clínico aceptable, u opcionalmente, una vía de administración no invasiva como la vía pulmonar, nasal, sublingual, bucal u oral.

35 Un objetivo de la presente invención es proporcionar un análogo de GLP-1 o derivado de éste química, física y enzimáticamente estable.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un análogo de GLP-1 o un derivado de éste que tenga un régimen de administración como el que se describió antes.

40 Otro objetivo de esta invención es proporcionar un análogo de GLP-1 o derivado de éste de acción prolongada que tenga elevada potencia (afinidad por el receptor), para reducir la dosis terapéutica empleada por ejemplo a una administración s.c. una vez a la semana o alternativamente una administración no invasiva.

45 Otro objetivo de esta invención es proporcionar un compuesto de GLP-1 con una alta afinidad de unión al receptor de GLP-1 (GLP-1R).

Otro objetivo de esta invención es proporcionar un compuesto de GLP-1 con una alta afinidad de unión al dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R).

50 Otro objetivo de esta invención es proporcionar un análogo de GLP-1 o un derivado de éste con elevada afinidad de unión a la albúmina que protege al péptido de la degradación proteolítica y reduce la depuración renal del péptido.

55 La potencia, la afinidad de unión al receptor de GLP-1 y posiblemente también al dominio extracelular del receptor de GLP-1 son propiedades de potencial importancia para el objetivo global de lograr derivados de GLP-1 de acción prolongada, estables y por supuesto terapéuticamente activos, con potencial para ser administrados una vez por semana.

Resumen de la invención

60 La invención se refiere a análogos truncados de GLP-1 (7-37) y sus derivados.

La invención se refiere a un análogo de GLP-1 que es un GLP-1(7-35) (SEQ ID Nº 1) modificado que tiene: i) un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-35), que incluyen a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-35), y b) un residuo de Arg en una posición

equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-35); o un derivado de éste.

La invención también se refiere a composiciones y usos de dichos derivados y análogos.

5 Opcionalmente el aminoácido o los aminoácidos en una posición equivalente a la posición 30, 31, 32, 33, 34 o 35 de GLP-1(7-35) pueden estar ausentes siempre que si el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33 o 34 está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.

10 También opcionalmente, el análogo de GLP-1 de la invención comprende un grupo amida C-terminal o un grupo ácido carboxílico C-terminal.

En otro aspecto, se proporcionan composiciones farmacéuticas y métodos y usos de los análogos y derivados de conformidad con la invención.

15 Descripción de la invención

Definiciones y realizaciones particulares

20 En la presente memoria, los términos siguientes tienen los significados indicados: Los términos "polipéptido" y "péptido" según se usan en este documento significan un compuesto formado por al menos cinco aminoácidos constituyentes unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético, así como aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no son codificados por el código genético son por ejemplo, γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados por síntesis química, es decir, los D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu ácido (α -aminobutírico), Tle (tert-butilglicina), β -alanina, ácido 3-aminometil benzoico y ácido antranílico.

30 Los 22 aminoácidos proteinogénicos son: alanina, arginina, asparragina, ácido aspártico, cisteína, cistina, glutamina, ácido glutámico, glicina, histidina, hidroxiprolina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina.

35 Por lo tanto un aminoácido no proteinogénico (también denominado no natural) es una porción que se puede incorporar en un péptido mediante enlaces peptídicos, pero no es un aminoácido proteinogénico. Los ejemplos son γ -carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, los D-aminoácidos como D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos no proteinogénicos comprenden los aminoácidos fabricados por síntesis química, es decir, los isómeros D de los aminoácidos codificados por el código genético como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido α -aminoisobutírico), Abu (ácido α -aminobutírico), Tle (tert-butilglicina), ácido 3-aminometil benzoico, ácido antranílico, desamino-histidina, los análogos beta de los aminoácidos como β -alanina etc., D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β -hidroxi-histidina, homohistidina, N⁶-acetil-histidina, α -fluorometil-histidina, α -metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico.

45 El término "análogo" según se usa en este documento con referencia a un polipéptido significa un péptido modificado en el que uno o más residuos de aminoácidos del péptido fueron sustituidos con otros residuos de aminoácidos y/o en el que uno o más residuos de aminoácidos del péptido fueron eliminados del péptido en el extremo C-terminal del mismo.

50 La expresión "péptido modificado" según se usa en este documento se refiere a un péptido modificado según se definió antes. Para los propósitos de la presente esta expresión se usa indistintamente con la expresión "secuencia peptídica modificada". Coherentemente, el término "modificación" cuando se usa en relación con secuencias peptídicas se refiere a sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos.

55 Para los propósitos de la presente, cualquier sustitución, eliminación y/o adición de aminoácido se refiere a la secuencia de GLP-1(7-35) humano que está incluida como SEQ ID N^o: 1. Sin embargo, la numeración de los residuos de aminoácidos en el listado de secuencias siempre comienza con N^o 1, en tanto para el propósito de la presente queremos, siguiendo la práctica establecida en el área, comenzar con el residuo de aminoácido N^o 7 y asignarle el número 7. Por consiguiente, en general, cualquier referencia en este documento al número de posición de la secuencia de GLP-1(7-35) es a la secuencia que comienza con His en la posición 7 y finaliza con Gly en la posición 35.

60 A menudo se utiliza un sistema simple para describir análogos: por ejemplo [Arg³⁴]GLP-1(7-37)Lys designa un análogo de GLP-1(7-37) en el que la lisina que naturalmente se encuentra en la posición 34 ha sido sustituida con

arginina y en el que se ha añadido una lisina al residuo de aminoácido terminal, es decir, a Gly³⁷.

La expresión "una posición equivalente a" cuando se usa en este documento para caracterizar a una secuencia de GLP-1(7-35) modificada se refiere a la posición correspondiente en la secuencia de GLP-1(7-35) natural (que tiene la secuencia SEQ ID N°: 1). Las posiciones correspondientes se deducen fácilmente por ejemplo, mediante simple escritura a mano y examinando de cerca. Alternativamente, se puede usar un programa estándar de alineación de proteínas o péptidos como "align" que es una alineación de Needleman-Wunsch. El algoritmo se describe en Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48: 443-453, y el programa de alineaciones descrito por Myers y W. Miller en "Optimal Alignments in Linear Space" CABIOS (aplicaciones informáticas en las biociencias) (1988) 4:11-17. Para la alineación, se puede usar la matriz de puntuación predeterminada BLOSUM50 y la matriz de identidad predeterminada, y la penalidad por el primer residuo en un hueco se puede fijar como -12 y las penalidades para residuos adicionales en un hueco en -2.

Se debe entender que todos los aminoácidos para los cuales no se menciona el isómero óptico son el isómero L.

La expresión "cada residuo de aminoácido en dirección 3'" según se usa en este documento se refiere a cada aminoácido ubicado hacia el extremo C-terminal en relación con un aminoácido específico. Por ejemplo Lys34 y Gly35 son cada uno residuos de aminoácidos en dirección 3' de Val33 en GLP-1 (7-35).

En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 8 aminoácidos. En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 7 aminoácidos. En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 6 aminoácidos. En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 5 aminoácidos. En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 4 aminoácidos. En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 3 aminoácidos. En realizaciones de la invención se modificaron un máximo de 2 aminoácidos.

En realizaciones de la invención, uno o más aminoácidos han sido eliminados del extremo C-terminal.

En un aspecto de la invención, el extremo C-terminal del análogo o derivado según la invención se puede terminar como un ácido o una amida. En un aspecto preferido, el extremo C-terminal del análogo o derivado de la invención es una amida.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que los aminoácidos en la posición 35, 36 y 37 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 28 aminoácidos. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que los aminoácidos en la posición 34, 35, 36 y 37 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 27 aminoácidos. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que los aminoácidos en la posición 33, 34, 35, 36 y 37 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 26 aminoácidos. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que los aminoácidos en la posición 32, 33, 34, 35, 36 y 37 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 25 aminoácidos. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que los aminoácidos en la posición 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 24 aminoácidos. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que los aminoácidos en la posición 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 y 37 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 23 aminoácidos.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene un grupo amida C-terminal.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene una sustitución elegida en el grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene una sustitución elegida del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene una sustitución elegida del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene una sustitución elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene dos sustituciones elegidas del grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34 en comparación con la secuencia 7-

35 de SEQ ID N° 1. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene dos sustituciones elegidas del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene tres sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene tres sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y dos sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y dos sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que tiene cuatro, cinco o seis sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y tres, cuatro o cinco sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene la secuencia de fórmula (I)

Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr- Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-
Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀- Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R
Formula (I) (SEQ ID No: 2)

en la que
Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu como alfa,alfa-dimetil-Glu;
Xaa₁₆ es Val o Leu;
Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;
Xaa₂₀ es Leu, Lys o Cys;
Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
Xaa₂₄ es Ala o Asn;
Xaa₂₅ es Ala o Val;
Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;
Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
Xaa₃₁ es Trp, Lys, Cys o está ausente;
Xaa₃₃ es Val, Lys, Cys o está ausente;
Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente;
Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;

R es amida o está ausente;

siempre que si Xaa₃₀, Xaa₃₁, Xaa₃₂, Xaa₃₃ o Xaa₃₄ está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.

5 En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene la secuencia de fórmula (II)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R

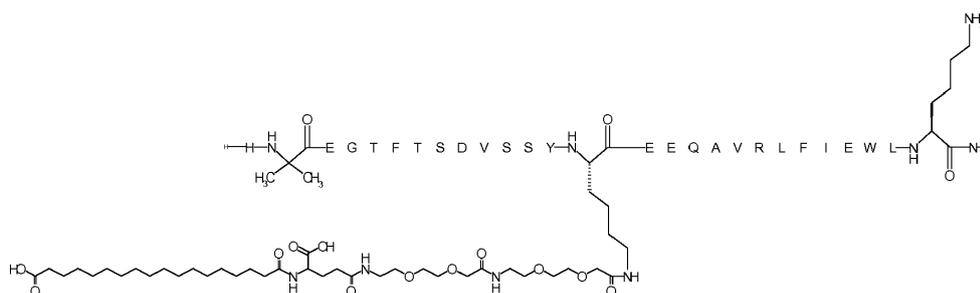
Formula (II) (SEQ ID No: 3)

10 en la que
 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico,
 15 ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
 Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
 Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
 Xaa₃₃ es Val, Lys o está ausente;
 20 Xaa₃₄ es Lys, Glu, Arg o está ausente;
 Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
 R es amida o está ausente;

25 En un aspecto de la invención, R está ausente. En otro aspecto de la invención, Xaa₃₅ y R están ausentes. En otro aspecto de la invención, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y R están ausentes. En otro aspecto de la invención, Xaa₃₃, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y R están ausentes. En otro aspecto de la invención, Xaa₃₀, Xaa₃₃, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y R están ausentes.

30 El término "derivado" según se usa en este documento en relación con un péptido significa un péptido modificado químicamente o un análogo de éste, en el que al menos un sustituyente no está presente en el péptido sin modificar o un análogo de éste, es decir, un péptido que se modificó covalentemente.

35 Las modificaciones típicas son amidas, carbohidratos, grupos alquilo, grupos acilo, ésteres y similares. Un ejemplo de un derivado según la invención es N-épsilon20 {2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi)acetil}- (Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Glu30, Lys33)GLP-1(7-33)amida (estructura 1) en el que Tyr, presente naturalmente en la posición 20, fue sustituido con lisina que se derivatizó en N-épsilon20 con épsilon20 {2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi)acetil}



40 Estructura 1

45 y en el que la alanina naturalmente presente en la posición 8 fue sustituida con Aib y la glicina en la posición 22 con glutamato y la alanina en la posición 25 con valina y la lisina en la posición 26 con arginina y el glutamato en la posición 27 con leucina y la alanina en la posición 30 con glutamato y la valina en la posición 33 con lisina amida.

50 En un aspecto de la invención, se proporciona un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila.

En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que el aminoácido que está pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina es un residuo de Lys o un residuo de Cys. En un aspecto, el aminoácido que está pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina es Lys. En un

aspecto, el aminoácido que está pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina es Cys. En un aspecto, el aminoácido C-terminal está pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina. En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 18, 20, 23, 31, 33, 34 o en el aminoácido C-terminal. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 18. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 20. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 23. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 31. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 33. En otro aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 34.

15 En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que ha sido derivatizado con un residuo de unión a la albúmina.

El término "derivatizado" según se usa en este documento significa unido químicamente a través de un enlace covalente. Por ejemplo un residuo de lisina o un residuo de cisteína se une a un residuo de unión a la albúmina a través de un enlace químico. Dicho enlace químico se puede obtener por ejemplo por derivatización de un grupo épsilon amino de lisina por acilación con un éster activo de un residuo de unión a la albúmina como un ácido graso de cadena larga.

Otros ejemplos de unión de dos porciones químicas según se usa en la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, la alquilación, la formación de éster, la formación de amida o el acoplamiento de maleimida.

El término "conector" según se usa en este documento significa un espaciador (los dos términos espaciador y conector se usan indistintamente en la presente memoria) que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina o un polímero de polietilenglicol.

En un aspecto de la invención, el conector contiene una o más unidades de alquilenglicol, como 1 a 5 unidades de alquilenglicol. Las unidades de alquilenglicol son en otro aspecto etilenglicol, propilenglicol o butilenglicol pero también pueden ser alquilenglicoles más grandes.

35 En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo elegido entre $-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{E}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$, en el que l, m y n son independientemente 1-20 y p es 0-10, Q es $-\text{Z}-(\text{CH}_2)_l\text{D}[(\text{CH}_2)_n\text{G}]_m(\text{CH}_2)_p-$, q es un número entero en el intervalo entre 0 y 5, cada D, E y G se eligen independientemente entre $-\text{O}-$, $-\text{NR}^3-$, $-\text{N}(\text{COR}^4)-$, $-\text{PR}^5(\text{O})-$, y $-\text{P}(\text{OR}^6)(\text{O})-$, en el que R^3 , R^4 , R^5 y R^6 representan independientemente hidrógeno o C_{1-6} -alquilo, Z se elige entre $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$, $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2\text{CH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})\text{CH}=\text{CH}-$, $-(\text{CH}_2)_s-$, $-\text{C}(\text{O})-$, $-\text{C}(\text{O})\text{O}-$ o $-\text{NHC}(\text{O})-$, en el que s es 0 o 1.

45 En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que l es 1 o 2, n y m son independientemente 1-10 y p es 0-10.

En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que D es $-\text{O}-$.

50 En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que E es $-\text{O}-$.

Aún en otro aspecto de la invención, el conector hidrófilo es $-\text{CH}_2\text{O}[(\text{CH}_2)_2\text{O}]_m(\text{CH}_2)_p\text{Q}_q-$, en el que m es 1-10, p es 1-3, y Q es $-\text{Z}-\text{CH}_2\text{O}[(\text{CH}_2)_2\text{O}]_m(\text{CH}_2)_p-$ en el que Z es el definido antes.

55 En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que q es 1.

En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que G es $-\text{O}-$.

60 En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que Z se elige del grupo constituido por $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, $-\text{C}(\text{O})\text{NHCH}_2-$ y $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$.

En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que q es 0.

En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que l es 2.

En otro aspecto de la invención, el conector es un conector hidrófilo como el definido antes en el que n es 2.

5 En un aspecto de esta invención, se usa un "conector hidrófilo" que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina con una porción química.

En un aspecto de esta invención, el conector hidrófilo es

10
$$-C(O)-(CHZ)_l-O-[(CH_2CH_2O)_m-(CH_2)_p-NHC(O)-(CH_2)_l-O-[(CH_2)_nO]_m-(CH_2)_p]_q-NH-$$

en el que l, m, n y p son independientemente 1-5, y q es 0-5.

Aún en otro aspecto de esta invención, el conector hidrófilo es

15
$$-C(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2 [NHC(O)-CH_2-O-CH_2CH_2O-CH_2CH_2]_q-NH-$$

en el que q es 0-5.

Aún en otro aspecto de esta invención, el conector hidrófilo es

20
$$-C(O)-CH_2-O-CH_2CH_2-O-CH_2CH_2 -NHC(O)-CH_2-O-CH_2CH_2O -CH_2CH_2-NH-$$

Aún en otro aspecto de la invención, el conector hidrófilo es $-(CH_2CH_2O)_{m+1}(CH_2)_pQ_q-$ en el que m y p son independientemente 0-10, y

25 Q es $-Z-(CH_2)_lD[(CH_2)_nG]_m(CH_2)_p-$ según se definió antes.

Aún en otro aspecto de la invención, el conector hidrófilo es

30
$$-(CH_2)_l-O-[(CH_2)_nO]_m-(CH_2)_p-[C(O)NH-(CH_2)_l-O-[(CH_2)_nO]_m-(CH_2)_p]_q-$$

en el que l, m, n y p son independientemente 1-5, y q es 0-5.

35 En otro aspecto de la invención, el conector contiene un residuo de aminoácido excepto Cys, o un dipéptido como Gly-Lys. En el presente texto, la expresión "un dipéptido como Gly-Lys" se usa para designar un dipéptido en el que el residuo de aminoácido C-terminal es Lys, His o Trp, preferentemente Lys, y en el que el residuo de aminoácido N-terminal se elige del grupo constituido por Ala, Arg, Asp, Asn, Gly, Glu, Gln, Ile, Leu, Val, Phe y Pro]. Los polímeros PEG están corrientemente disponibles en el comercio o se pueden preparar por técnicas bien conocidas por los expertos en el área.

40 En un aspecto de la invención, el polímero PEG tiene un peso molecular mayor de 700 D, en otro aspecto tiene un peso molecular mayor de 5 kD, aún en otro aspecto mayor de 10 kD, e incluso en otro aspecto mayor de 20 kD. El polímero PEG puede ser lineal o ramificado. En los casos en que el polímero PEG es mayor de 20 kDa, el polímero PEG tiene preferentemente una estructura ramificada, como por ejemplo un péptido pegilado ramificado de 43 kD (Shearwater 2001 N° de catálogo 2D3XOT01, mPEG2-MAL).

45 La unión de un PEG a un péptido intacto se puede llevar a cabo uniendo el PEG en el lado opuesto de la superficie del péptido que interacciona con el receptor.

50 Existen varias estrategias para acoplar PEG a los péptidos (véase, por ej. Veronese, Biomaterials 22:405-417, 2001), todas las cuales se incorporan en este documento, por referencia, en su totalidad. Los expertos, serán capaces por lo tanto que utilizar técnicas bien conocidas para unir el polímero PEG a amilina humana o los análogos de amilina descritos aquí.

55 En resumen, la PEGilación de la cisteína es un método para la PEGilación específica del sitio, y se puede llevar a cabo introduciendo una única mutación de cisteína en una de las posiciones específicas de la amilina humana o del análogo de la amilina y después haciendo reaccionar el péptido resultante con un reactivo de PEGilación específico de la cisteína, como PEG-maleimida. Puede ser necesario mutar el péptido para permitir la PEGilación específica del sitio. Por ejemplo, si el péptido contiene residuos de cisteína, éstos deberán ser sustituidos con aminoácidos conservativos para asegurar la PEGilación específica del sitio. Además, se pueden agregar conectores rígidos, incluidos, pero no exclusivamente, "GGS", "GGSGGS", y "PPPS" al extremo C-terminal, pero antes del sitio de la

60 unión del PEG (es decir un único residuo de cisteína).

En un aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un residuo lipófilo. En otro aspecto, el residuo lipófilo se une a un residuo de lisina opcionalmente a través de un conector, por conjugación química como por

ejemplo alquilación, acilación, formación de éster o formación de amida o a un residuo de cisteína por acoplamiento de maleimida.

5 En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina se carga negativamente a pH fisiológico. En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina contiene un grupo que puede estar cargado negativamente. Un grupo preferido que puede estar cargado negativamente es un grupo ácido carboxílico.

10 Aún en otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina se elige del grupo constituido por un grupo alquilo de cadena lineal, un grupo alquilo ramificado, un grupo que tiene un grupo ácido ω -carboxílico, y un esqueleto de ciclopentanofenantreno parcial o completamente hidrogenado.

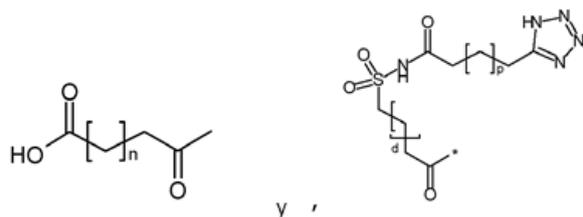
En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un residuo cibacronilo.

15 En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina tiene entre 6 y 40 átomos de carbono, entre 8 y 26 átomos de carbono o entre 8 y 20 átomos de carbono.

20 En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo elegido del grupo constituido por $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_r\text{CO}-$, en el que r es un número entero entre 4 y 38, preferentemente un número entero entre 4 y 24, más preferentemente elegido del grupo constituido por $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{CO}-$, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{CO}-$ y $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{CO}-$.

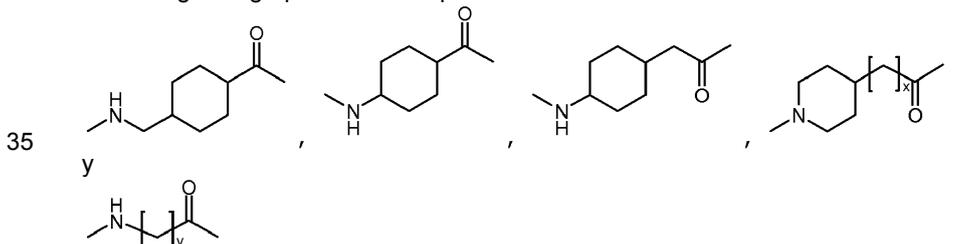
En otro aspecto de la invención, el residuo de unión a la albúmina es un grupo acilo de un ácido alcano de cadena lineal o ramificada α,ω -dicarboxílico.

25 En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatizó con A-B-C-D- en el que A- se elige del grupo constituido por:



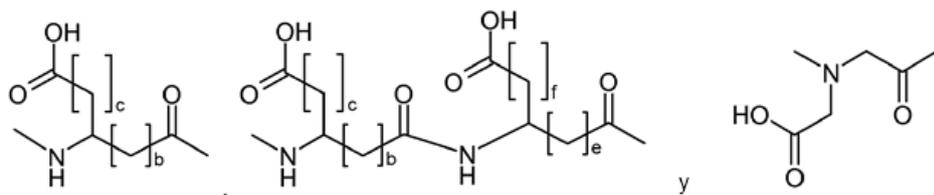
en el que n se elige del grupo constituido por 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se elige del grupo constituido por 10, 11, 12, 13 y 14, y d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

-B- se elige del grupo constituido por



donde x se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, e y se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

40 -C- se elige del grupo constituido por



donde b y e se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2, y c y f se eligen cada uno

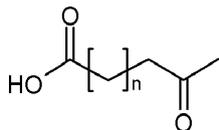
independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2 con la condición de que b sea 1 o 2 cuando c es 0, o que b sea 0 cuando c es 1 o 2, y e sea 1 o 2 cuando f es 0, o e sea 0 cuando f es 1 o 2, y - D- está unido al residuo de dicho aminoácido y es un conector.

5 En un aspecto de la invención, un residuo de aminoácido del análogo según la invención se derivatiza con A-B-C-D-.

En un aspecto, el residuo de aminoácido derivatizado contiene un grupo amino. En otro aspecto, el residuo de aminoácido derivatizado contiene un grupo amino primario en una cadena lateral. Aún en otro aspecto, el residuo de aminoácido derivatizado es lisina.

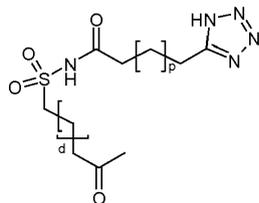
10

En un aspecto, A- es



15 En un aspecto, n se elige del grupo constituido por 15 y 17, y más preferentemente es 17.

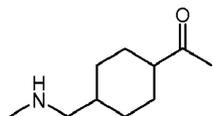
En un aspecto, A- es



20 En un aspecto, p se elige del grupo constituido por 12, 13 y 14, y más preferentemente es 13. En un aspecto, d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, más preferentemente 0, 1 y 2, y muy preferentemente es 1. En un aspecto, d se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2, y p se elige del grupo constituido por 12, 13 o 14, más preferentemente d se elige del grupo constituido por 1 y 2, y p se elige del grupo constituido por 13 y 14, y muy preferentemente d es 1 y p es 13.

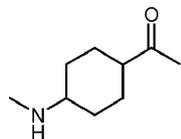
25

En un aspecto, -B- es

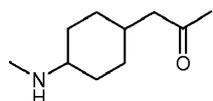


30

En un aspecto, -B- es

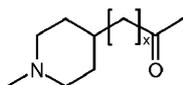


35 En un aspecto, -B- es



40

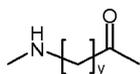
En un aspecto, -B- es



En un aspecto, x se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2, más preferentemente x se elige del grupo constituido por 0 y 1, y muy preferentemente x es 1.

5

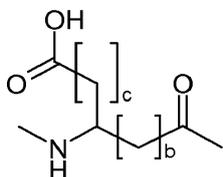
En un aspecto, -B- es



En un aspecto, y se elige del grupo constituido por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 y muy preferentemente y se elige del grupo constituido por 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

10

En un aspecto, -C- es

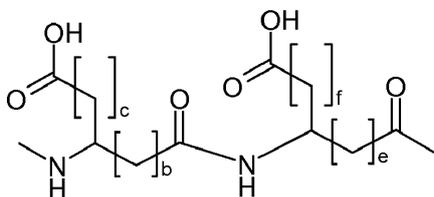


15

En un aspecto, c se elige del grupo constituido por 0 y 1, y b se elige del grupo constituido por 1 y 2, más preferentemente b es 1 y c es 0.

En un aspecto, -C- es

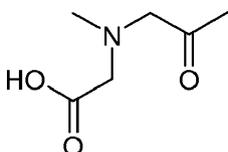
20



En un aspecto, f se elige del grupo constituido por 0 y 1, y e se elige del grupo constituido por 1 y 2, más preferentemente e es 1 y f es 0.

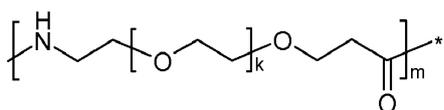
25

En un aspecto, -C- es

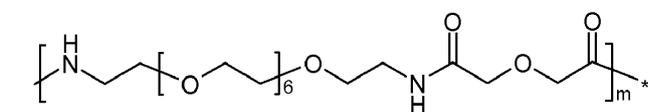


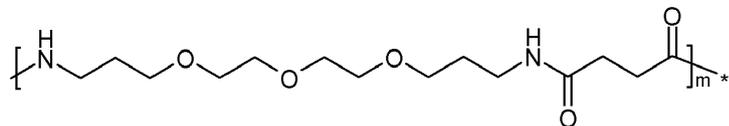
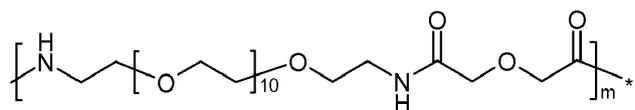
30

En un aspecto, D se elige del grupo constituido por



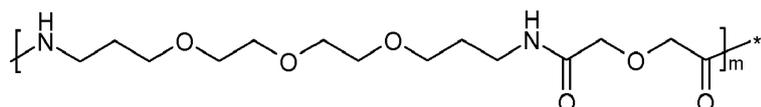
35





y

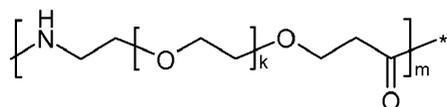
5



y donde k se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

10

En un aspecto, -D- es



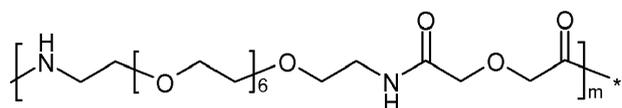
15

En un aspecto, k se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 11 y 27, más preferentemente k es 1. En un aspecto, m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

En un aspecto, -D- es

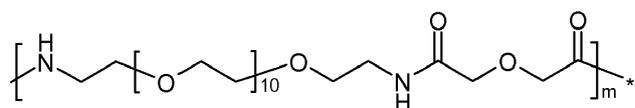
20

En un aspecto, -D- es



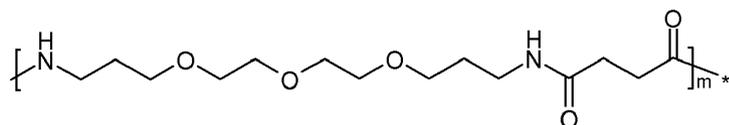
En un aspecto, -D- es

25



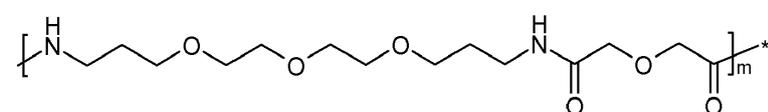
En un aspecto, -D- es

30



En un aspecto, -D- es

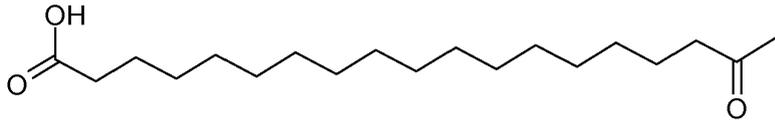
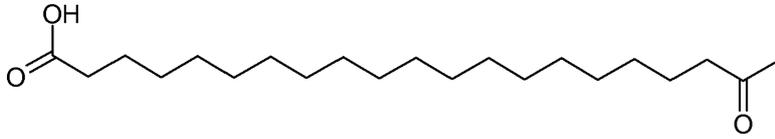
35



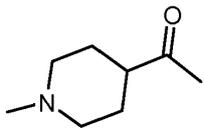
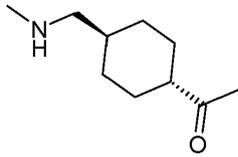
En un aspecto, m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

En un aspecto, A-B-C-D- se elige y se combina entre

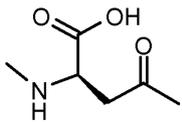
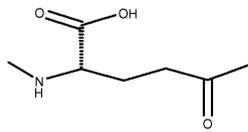
A-

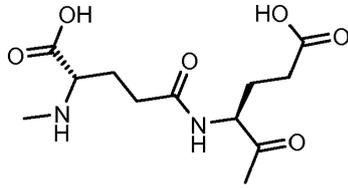
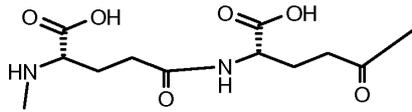


-B-

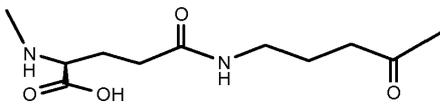
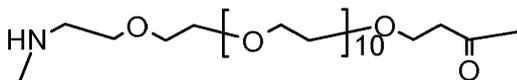
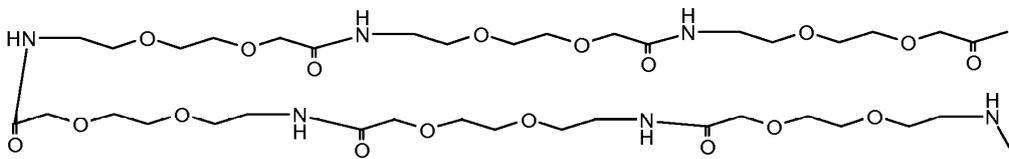
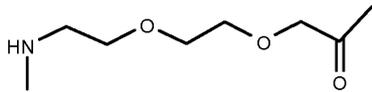
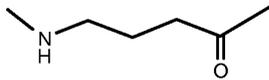
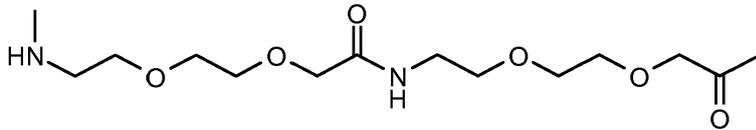


-C-



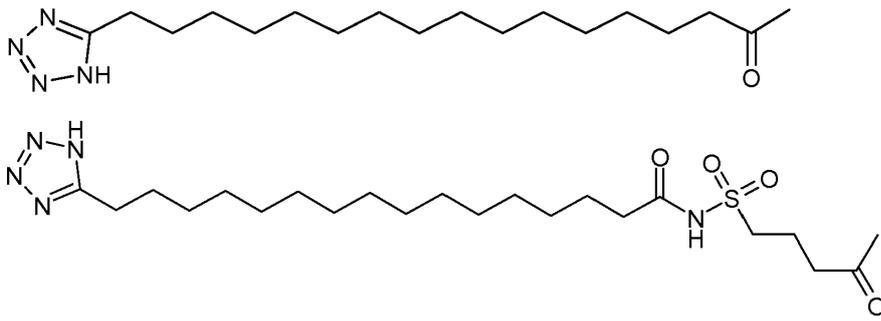


-D-

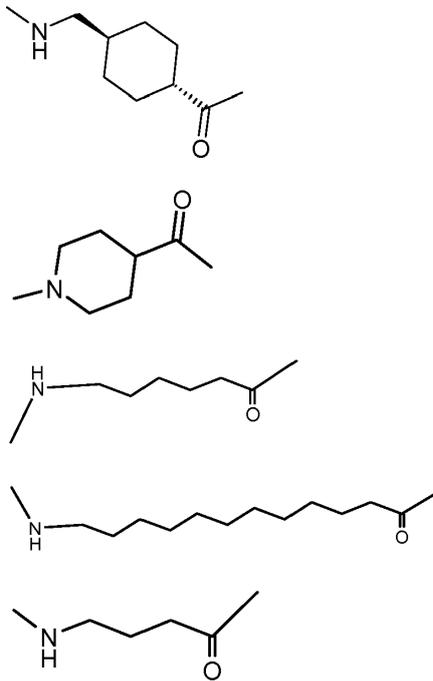


En un aspecto, A-B-C-D- se elige y se combina entre

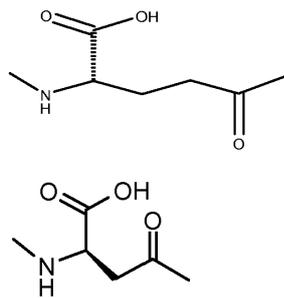
A-

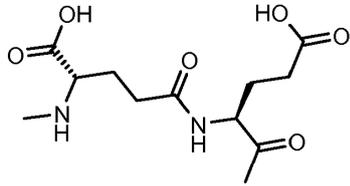
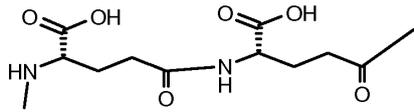


-B-

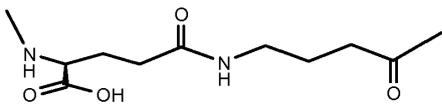
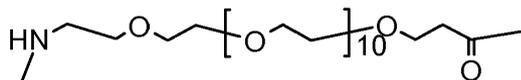
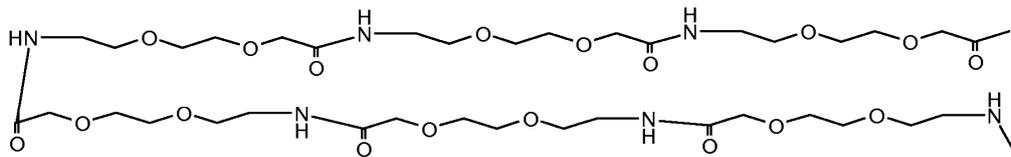
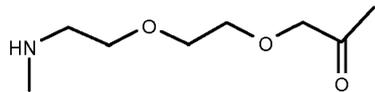
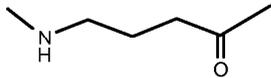
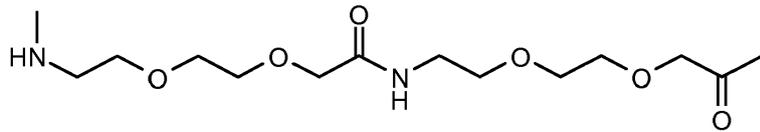


-C-

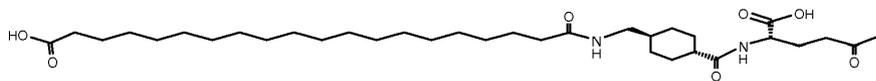




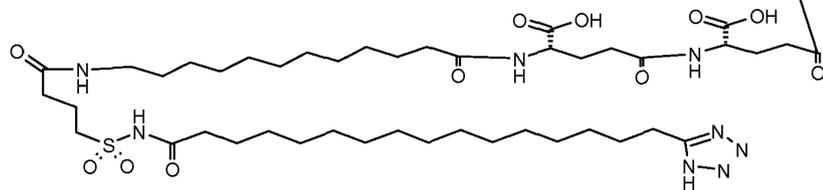
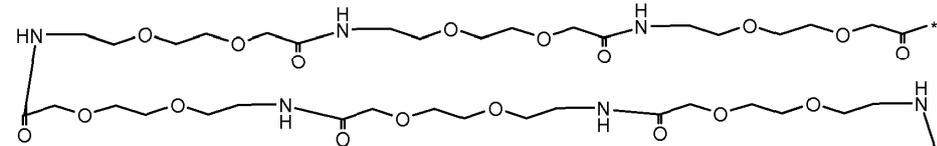
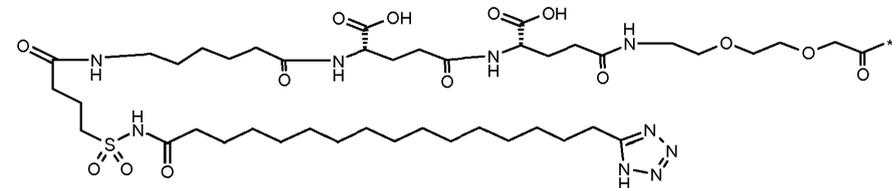
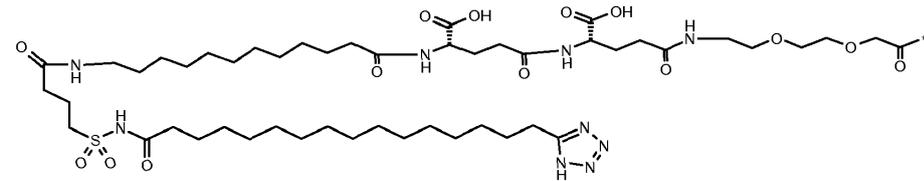
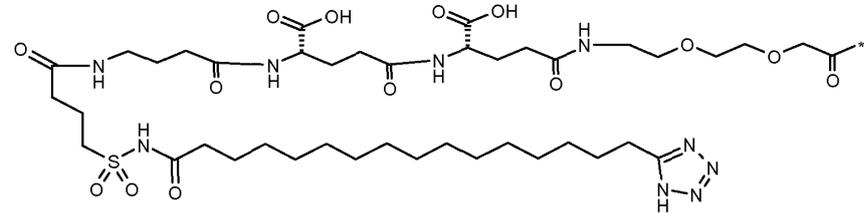
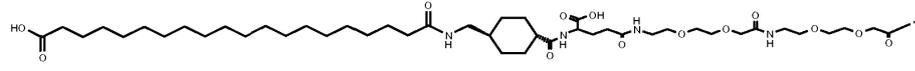
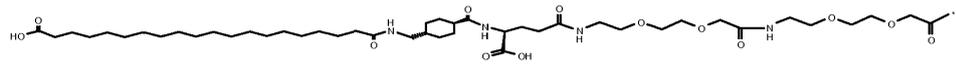
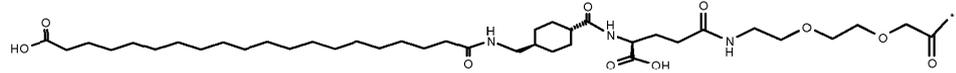
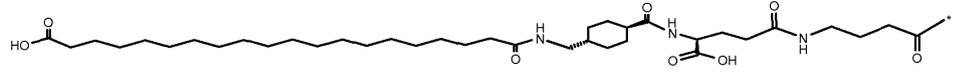
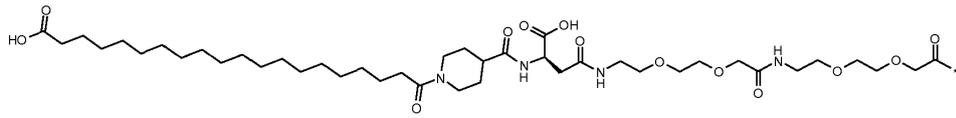
-D-

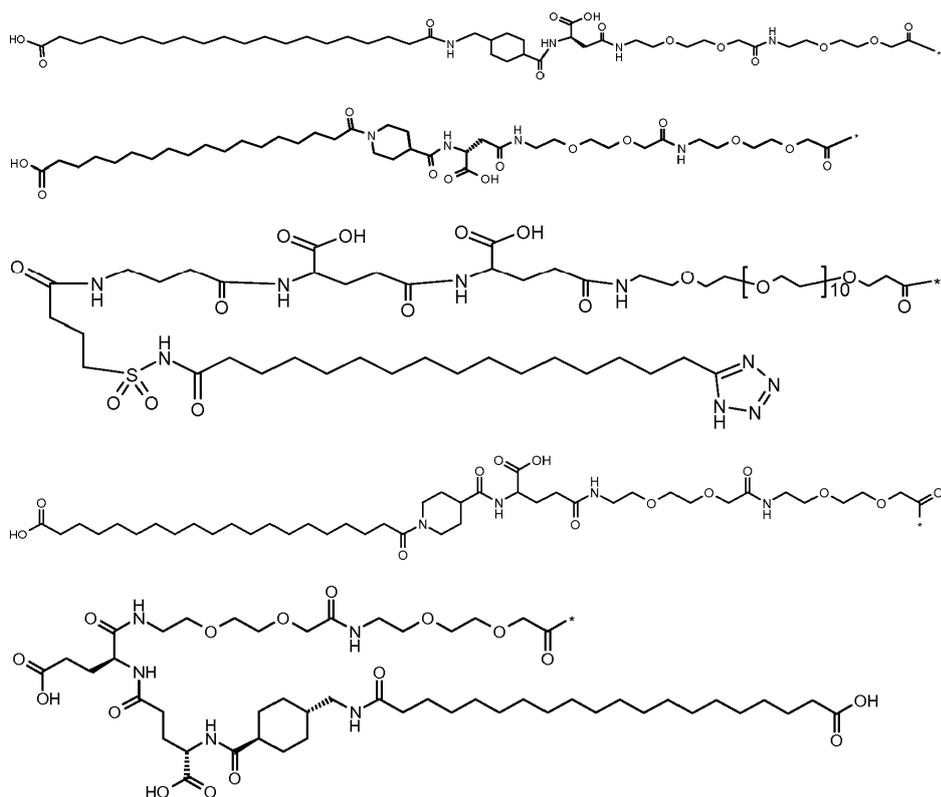


En un aspecto, A-B-C-D- se elige del grupo constituido por



5





En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D, y donde el derivado se une a albúmina.

5

En un aspecto, A-B-C-D está compuesto por un fragmento de unión a la albúmina A-B-C- y un conector hidrófilo D.

La expresión "péptido GLP-1" según se usa en este documento significa GLP-1(7-35) (SEQ ID N° 1) o un análogo de GLP-1(7-35).

10

En una realización el análogo de GLP-1 o el derivado de éste según la invención es un agente insulínico.

En el aspecto de la invención, en el que el análogo se derivatiza, cualquier posición de aminoácido en el análogo de GLP-1 se puede derivatizar. En un aspecto de la invención, el residuo de aminoácido que se derivatiza contiene un grupo amino. Los ejemplos de residuos de aminoácidos que contienen un grupo amino son lisina, ornitina, lisina épsilon-N-alquilada como épsilon-N metil lisina, O-aminoetilserina, O-aminopropilserina o serinas O alquiladas más largas que contienen un grupo amino primario o secundario en la cadena lateral.

15

En otro aspecto de la invención, el residuo de aminoácido derivatizado contiene un grupo amino primario en una cadena lateral. Los ejemplos de residuos de aminoácidos que contienen un grupo amino primario son lisina, ornitina, O-aminoetilserina, O-aminopropilserina o serinas O alquiladas más largas que contienen un grupo amino primario en la cadena lateral.

20

Aún en otro aspecto de la invención, el residuo de aminoácido derivatizado es lisina. En otro aspecto de la invención, el derivado según la invención sólo se derivatiza en una posición, por ejemplo, sólo se derivatiza un residuo de aminoácido.

25

En otro aspecto de esta invención, el residuo de aminoácido que se derivatiza es cisteína.

30 Propiedades funcionales

Varios compuestos de GLP-1 de la invención han sido sintetizados y ensayados como se describe en la parte experimental.

35 Los compuestos de GLP-1 de la invención tienen varias propiedades ventajosas y beneficiosas como se explica más adelante, haciendo referencia a los ejemplos.

La expresión "agente insulínico" según se usa en este documento significa un análogo de GLP-1 o derivado de éste que es un agonista del receptor de GLP-1 humano, es decir un análogo de GLP-1 o derivado de éste que estimula la formación de cAMP en un medio adecuado que contiene el receptor de GLP-1 humano (un medio de ese tipo se da a conocer más adelante).

En un primer aspecto, el análogo o derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia aceptable, preferentemente una alta potencia (en el receptor).

La potencia de un agente insulínico como los compuestos de GLP-1 de la invención se puede determinar calculando el valor de CE_{50} de la curva dosis-respuesta, por ej. como se describe en el ejemplo 21.

En realizaciones particulares, (i) se utilizan células de riñón de cachorro de hámster (BHK) que expresan el receptor de GLP-1 humano clonado, preferentemente BHK-467-12A, más preferentemente BHK-467-12A (tk-ts13); (ii) las células se cultivan en medio DMEM con la adición de 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 5% de suero fetal de ternero y 0.5 mg/mL de Geneticin G-418 (Life Technologies), preferentemente a 5% de CO_2 ; (iii) las células, preferentemente a aproximadamente 80% de confluencia, se lavan dos veces en solución salina tamponada con fosfato (PBS); (iv) las células se recogen con una solución acuosa de la sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético, como Versene; (v) se preparan las membranas plasmáticas de las células por homogeneización, preferentemente en tampón 1; (vi) el homogeneizado se centrifuga, por ejemplo a 48 000 x g durante 15 min a 4 °C; y/o (vii) el sedimento se suspende por homogeneización en tampón 2 (preferentemente se repiten los pasos (vi) y (vii), por ejemplo una o dos veces más). El ensayo funcional del receptor se puede llevar a cabo como se describe en el ejemplo 21 midiendo el AMP cíclico (cAMP) como respuesta a la estimulación por el agente insulínico. El cAMP formado se cuantifica preferentemente con el kit de cAMP AlphaScreen™ (Perkin Elmer Life Sciences). Las incubaciones se pueden llevar a cabo en la mitad del área de placas de microtitulación de 96 pocillos en un volumen total de 50 µL de tampón 3 (Tris-HCl 50 mM, HEPES 5 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7.4) y con las adiciones siguientes: ATP 1 mM, GTP 1 µM, 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX) 0.5 mM, Tween-20 al 0.01 %, BSA al 0.1%, 6 µg de preparación de membrana, 15 µg/mL de perlasceptoras, 20 µg/mL de perlas dadoras preincubadas con biotil-cAMP 6 nM. Los análogos o derivados a ensayar respecto a la actividad agonista se disuelven y diluyen preferentemente en tampón 3. GTP se prepara en el momento para cada experimento. La placa se incuba en la oscuridad con agitación lenta durante tres horas a temperatura ambiente seguido de recuento en el instrumento Fusion™ (Perkin Elmer Life Sciences). Se trazan curvas de concentración-respuesta para cada análogo o derivado y se calculan los valores de CE_{50} utilizando un modelo logístico de cuatro parámetros con Prism v. 4.0 o 5.0 (GraphPad, Carlsbad, CA).

En una primera realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el ensayo de cAMP, inferior a 10.00, preferentemente inferior a 9.00, más preferentemente inferior a 8.00, incluso más preferentemente inferior a 7.00, y muy preferentemente inferior a 6.00 (nM).

En una segunda realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el ensayo de cAMP, inferior a 5.00, preferentemente inferior a 4.00, más preferentemente inferior a 3.00, incluso más preferentemente inferior a 2.00 y muy preferentemente inferior a 1.00 (nM).

En una tercera realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el ensayo de cAMP, inferior a 0.80, preferentemente inferior a 0.60, más preferentemente inferior a 0.40, incluso más preferentemente inferior a 0.20, y muy preferentemente inferior a 0.10 (nM).

En una cuarta realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el ensayo de cAMP, inferior a 0.090, preferentemente inferior a 0.080, más preferentemente inferior a 0.070, incluso más preferentemente inferior a 0.060 y muy preferentemente inferior a 0.050 (nM).

En una quinta realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una potencia (CE_{50} en nM), determinada mediante el ensayo de cAMP, inferior a 0.040, preferentemente inferior a 0.030, más preferentemente inferior a 0.020, y muy preferentemente inferior a 0.010 (nM).

En consecuencia, los ejemplos de intervalos de potencia (CE_{50} en nM, determinada mediante el ensayo de cAMP) de los derivados de GLP-1 de la invención son 0.010-10.0, 0.010-8.0, 0.010-6.0, 0.010-4.0, 0.010-2.0, 0.010-1.00, 0.010-0.80, 0.010-0.60, 0.010-0.40, 0.010-0.30, 0.010-0.20, 0.010-0.10, y 0.010-0.90 (nM), preferentemente 0.010-0.40, 0.010-0.30, 0.010-0.20, 0.010-0.10, y 0.010-0.90 (nM).

En un segundo aspecto, el análogo de GLP-1 o derivado de éste (" compuesto de GLP-1") tiene una alta afinidad por el receptor de GLP-1. La afinidad por el receptor de GLP-1 se puede determinar como se describe en el ejemplo 23, es decir, mediante el desplazamiento de ^{125}I -GLP-1 del receptor. Se pueden usar células BHK para la preparación de la membrana, preferentemente la cepa tk-ts13. Las membranas se pueden purificar, preferentemente como se

describe en el ejemplo 23. Un método de ensayo de unión preferido es el ensayo de SPA del ejemplo 23. El valor de CI_{50} se puede leer de la curva (de unión) resultante como la concentración que desplaza 50% de ^{125}I -GLP-1 del receptor.

5 En una primera realización particular, el valor de CI_{50} es inferior a 500 nM, preferentemente inferior a 400 nM, más preferentemente inferior a 300 nM, aún más preferentemente inferior a 200 nM, y muy preferentemente inferior a 100 nM.

10 En una segunda realización particular, el valor de CI_{50} es inferior a 80 nM, preferentemente inferior a 60 nM, más preferentemente inferior a 50 nM, aún más preferentemente inferior a 40 nM, y muy preferentemente inferior a 30 nM.

15 En una tercera realización particular, el valor de CI_{50} es inferior a 20 nM, preferentemente inferior a 15 nM, más preferentemente inferior a 10 nM, aún más preferentemente inferior a 5.0 nM, y muy preferentemente inferior a 4.0 nM.

20 En una cuarta realización particular, el valor de CI_{50} es inferior a 3.0 nM, preferentemente inferior a 2.0 nM, más preferentemente inferior a 1.0 nM, aún más preferentemente inferior a 0.80 nM, y muy preferentemente inferior a 0.60 nM.

25 En una quinta realización particular, el valor de CI_{50} es inferior a 0.50 nM, preferentemente inferior a 0.40 nM, más preferentemente inferior a 0.30 nM, aún más preferentemente inferior a 0.20 nM, y muy preferentemente inferior a 0.10 nM.

Concordantemente, los intervalos ejemplares de CI_{50} son: 0.1-400, 0.2-300, 0.3-200, 0.4-100, 0.5-50 y 1-10 nM.

30 En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o un derivado de éste con alta afinidad de unión al dominio N-terminal extracelular aislado del receptor GLP-1R (nGLP-1R). La afinidad se puede medir como la capacidad para desplazar a ^{125}I -Exendina-4(9-39) de la unión a nGLP-1R, por ej. como se describe en el ejemplo 22.

35 En este ensayo la exendina-4 se une a nGLP-1R con un valor de CI_{50} de 5 nM, GLP-1(7-37) se une a nGLP-1R con un valor de CI_{50} de 1120 nM y la liraglutida se une a nGLP-1R con un valor de CI_{50} de 1500 nM. En un aspecto de la invención, los análogos de GLP-1 o derivados de éste de esta invención se unen a nGLP-1R con un valor de CI_{50} inferior al de la liraglutida. Más preferentemente los análogos de GLP-1 o derivados de éste de esta invención se unen a nGLP-1R con un valor de CI_{50} inferior a 100 nM o aún más preferentemente inferior a 10 nM o incluso inferior a 5 nM.

40 La proteína nGLP-1R se puede preparar como describieron Runge et al 2007 (en Biochemistry, vol. 46, pp. 5830-5840). Después la proteína se biotinila e inmoviliza, preferentemente en perlas de SPA recubiertas con estreptavidina. La nGLP1R en un tampón adecuado como $NaHCO_3$ 0.1M se biotinila usando 75 μ g de BNHS (Sigma H1759) para 1 mg de proteína. A continuación nGLP1R biotinilada se dializa preferentemente contra PBS. Todo los reactivos y análogos o derivados se diluyen preferentemente en PBS con 0.05% v/v de Tween 20. El ensayo de unión se puede llevar a cabo en placas de 96 pocillos OptiPlates (PerkinElmer 6005290) en un volumen final de 200 μ l. Cada pocillo puede contener 2 mg de perlas de SPA recubiertas con estreptavidina (PerkinElmer RPNQ007), 0.1 pmol de nGLP1R biotinilada, 50 pCi de ^{125}I -Exendina (9-39) y el péptido de prueba en concentraciones finales adecuadas que varían de 1000 nM a 0.064 nM. Las placas se incuban en un agitador, preferentemente a temperatura ambiente durante 3 horas. Las partículas de SPA se pueden sedimentar por centrifugación, por ej. durante 10 min a 1500 rpm, y las placas se cuentan por ejemplo en un TopCount-NXT (PerkinElmer).

50 La afinidad se puede expresar mediante un valor de CI_{50} , que se lee de la curva como la concentración del derivado de GLP-1 que desplaza 50% de ^{125}I -Exendina-4(9-39) de la unión a nGLP-1R.

55 En una primera realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI_{50} nM en el ensayo del ejemplo 22, inferior a 1500, preferentemente inferior a 1000, aún más preferentemente inferior a 900, y muy preferentemente inferior a 800 (nM).

60 En una segunda realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI_{50} nM en el ensayo del ejemplo 22, inferior a 700, preferentemente inferior a 600, aún más preferentemente inferior a 500, y muy preferentemente inferior a 400 (nM).

En una tercera realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI_{50} nM en el ensayo del ejemplo 22, inferior a 300,

preferentemente inferior a 200, aún más preferentemente inferior a 100, y muy preferentemente inferior a 80 (nM).

En una cuarta realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI_{50} nM en el ensayo del ejemplo 22, inferior a 60, preferentemente inferior a 50, aún más preferentemente inferior a 40, y muy preferentemente inferior a 30 (nM).

En una quinta realización particular, el derivado de GLP-1 de la invención tiene una afinidad por el dominio extracelular del receptor de GLP-1 (nGLP-1R), medida como CI_{50} nM en el ensayo del ejemplo 22, inferior a 20, preferentemente inferior a 15, aún más preferentemente inferior a 10.0, y muy preferentemente inferior a 5.0 (nM).

Concordantemente, los ejemplos de intervalos de afinidad por nGLP-1R (CI_{50} en nM) del derivado de GLP-1 son: 5-1500, 5-1000, 10-500, 20-300, 50-500, 10-500 y 5-50 (nM).

La expresión "protegido contra DPP-IV" según se usa en este documento por referencia a un polipéptido significa un polipéptido que ha sido modificado químicamente con el fin de tornar dicho derivado resistente a la peptidasa plasmática dipeptidil aminopeptidasa-4 (DPP-IV). La enzima DPP-IV en el plasma es conocida por estar implicada en la degradación de varias hormonas peptídicas, por ej. GLP-1, GLP-2, exendina-4, etc. Por lo tanto, se está realizando un esfuerzo considerable para desarrollar análogos y derivados de los polipéptidos sensibles a la hidrólisis mediada por DPP-IV a fin de reducir la tasa de degradación por DPP-IV.

En una realización un análogo de GLP-1 o derivado de éste según la invención es un análogo de GLP-1 o derivado de éste protegido contra DPP-IV.

En una realización un análogo de GLP-1 o derivado de éste según la invención es un análogo de GLP-1 o derivado de éste protegido contra DPP-IV que es más resistente a la DPP-IV que la liraglutida.

La resistencia de un péptido a la degradación por la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el ensayo de degradación siguiente:

Se incuban alícuotas del péptido (5 nmol) a 37 °C con 1 µL de dipeptidil amino peptidasa IV purificada, correspondiente a una actividad enzimática de 5 mU, durante 10-180 minutos en 100 µL de tampón de trietilamina-HCl 0.1 M, pH 7.4. Las reacciones enzimáticas se terminan por adición de 5 µL de ácido trifluoroacético al 10%, y los productos de degradación del péptido se separan y se cuantifican usando análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican en una columna Vydac C18 de poro ancho (poros de 30 nm, partículas de 5 µm) de 250 x 4.6 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 1 ml/min con gradientes lineales, en etapas, de acetonitrilo en 0.1% de ácido trifluoroacético (0% de acetonitrilo durante 3 min, 0-24% de acetonitrilo durante 17 min, 24-48% de acetonitrilo durante 1 min) según Siegel et al., Regul. Pept. 1999; 79:93-102 y Mentlein et al. Eur. J. Biochem. 1993; 214:829-35. Los péptidos y sus productos de degradación se pueden seguir por su absorbancia a 220 nm (enlaces peptídicos) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y se cuantifican por integración de las áreas de sus picos con relación a los de los estándares. La velocidad de hidrólisis de un péptido por la dipeptidil aminopeptidasa IV se calcula a tiempos de incubación que resulten en menos de 10% de hidrólisis del péptido.

Alternativamente, la resistencia de un péptido a la degradación por la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina mediante el ensayo de degradación siguiente:

Se incuban alícuotas del péptido (4 nmol) a 37 °C con 10.9 mU de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada durante 22 horas, en 40 µL de tampón Tris-HCl 0.085 M, pH 8.0, en presencia o ausencia de 1.6% de seroalbúmina humana. Luego de 0, 4 y 22 horas se toman muestras de 10 µl y se terminan las reacciones enzimáticas por mezcla con 100 µl de ácido trifluoroacético al 1%. Los productos de degradación del péptido se separan y se cuantifican mediante análisis de HPLC. Un método para realizar este análisis es: las mezclas se aplican en una columna Agilent Zorbax 300SB-C18 (partículas de 5 µm) de 150 x 2.1 mm y se eluyen a una velocidad de flujo de 0.5 ml/min con un gradiente lineal de ácido trifluoroacético al 0.1% a acetonitrilo 100% con 0.07% de TFA en 30 minutos. Los péptidos y sus productos de degradación se monitorean por su absorbancia a 214 nm, y se cuantifican por integración de las áreas de sus picos. La estabilidad de un péptido frente a la dipeptidil aminopeptidasa IV se determina como el área del pico del péptido intacto con relación a la suma de las áreas de los picos del péptido intacto y el producto de degradación que carece de los dos aminoácidos amino terminales después de la escisión.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" según se usa en este documento significa adecuado para aplicaciones farmacéuticas normales, es decir, que no produce eventos adversos graves en los pacientes, etc.

El término "excipiente" según se usa en este documento significa los compuestos químicos que normalmente se agregan a las composiciones farmacéuticas, por ej. tampones, agentes de tonicidad, conservantes y similares.

La expresión "cantidad eficaz" según se usa en este documento significa una dosis que es suficiente para ser eficaz

para tratar a un paciente en comparación con no tratarlo.

La expresión "composición farmacéutica" según se usa en este documento significa un producto que contiene un análogo de GLP-1 o derivado de éste activo según la invención, junto con excipientes farmacéuticos como tampón, conservante y opcionalmente un modificador de la tonicidad y/o un estabilizante. Por lo tanto una composición farmacéutica también se conoce como una formulación farmacéutica.

La expresión "tratamiento de una enfermedad" según se usa en este documento significa el manejo y la atención de un paciente que presenta una enfermedad, una afección o un trastorno. El propósito del tratamiento es combatir la enfermedad, la afección o el trastorno. El tratamiento incluye la administración del análogo o derivado activo según la invención para eliminar o controlar la enfermedad, la afección o el trastorno, así como para aliviar los síntomas o las complicaciones asociados a la enfermedad, la afección o el trastorno.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que se puede unir a la albúmina y al receptor de GLP-1 simultáneamente.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que se une al receptor de GLP-1 con una afinidad inferior a 100 nM, preferentemente inferior a 30 nM en presencia de 2% de albúmina.

En otro aspecto, el análogo de GLP-1 o derivado de éste ("compuesto de GLP-1") tiene una afinidad por el receptor de GLP-1 que sólo disminuye parcialmente al comparar la afinidad en presencia de muy baja concentración (e.g. 0.005% a 0.2%) de albúmina humana con la afinidad en presencia de 2% de albúmina humana. El cambio en la afinidad de unión en estas condiciones es de menos de 50 veces, preferentemente de menos de 30 veces y más preferentemente de menos de 10 veces.

En otro aspecto la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que es estable frente a la degradación química que se observa normalmente con exendina-4, especialmente la oxidación y la desamidación.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una alta potencia en el receptor. Para análogos con unión a la albúmina muy fuerte, con afinidad de unión a la albúmina menor de 100 nM, la potencia de GLP-1 es mejor que 3 micromolar y preferentemente la potencia es mejor que 1 micromolar en el ensayo de cAMP.

Para análogos o derivados de unión a la albúmina fuertes con afinidad de unión a la albúmina menor de 500 nM, la potencia de GLP-1 es mejor que 1 micromolar y preferentemente la potencia es mejor que 0.2 micromolar en el ensayo de cAMP.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una alta afinidad de unión a la albúmina. Los análogos o derivados de esta invención tienen una afinidad de unión a la albúmina que es menor de 1 micromolar. Más preferentemente los análogos o derivados de esta invención tienen una afinidad de unión a la albúmina que es menor de 500 nM y aún más preferentemente menor de 200 nM o incluso menor de 100 nM.

La afinidad de unión a la albúmina se puede medir usando el ensayo siguiente:

Ensayo de unión a la albúmina:

La afinidad del análogo de GLP-1 o derivado de éste por la seroalbúmina humana (HSA) se mide mediante un ensayo de competición de centelleo por proximidad (SPA). Se incuban perlas de estreptavidina-SPA (GE Healthcare RPNQ0009) con HSA biotinilada durante 5 horas.

Las perlas se lavan con tampón para eliminar la HSA que no está unida. Las perlas se mezclan con un análogo acilado de GLP-1 marcado con ¹²⁵I como N-épsilon26-[2-(2-{2-[2-(2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi]acetilamino]etoxi)etoxi]acetil[[Aib8,125I-Tyr19,Arg34]GLP-1(7-37) o N-épsilon37-[2-(2-[2-((S)-4-((S)-4-(12-[4-(16-(1H-tetrazol-5-il)hexadecanoilsulfamoil)butirilamino]dodecanoilamino)-4-carboxibutirilamino)-4-carboxibutirilamino]etoxi]etoxi]acetil[[Aib8,125I-Tyr19,Glu22,Arg26,34,Lys37]GLP-1(7-37)-NH₂ en un tampón que contiene Hepes 100 mM, NaCl 100 mM, MgSO₄ 10 mM, 0.025% de Tween-20, pH 7.4. La mezcla se transfiere con pipeta a los pocillos de una placa Perkin Elmer Optiplate-96 6005290 (100 µl por pocillo) y se agregan 100 µl de una serie de diluciones del análogo o derivado de GLP-1 que se va a medir en el mismo tampón. Después de 20 horas de balanceo suave a temperatura ambiente las placas se centrifugan y se cuentan en un TopCounter. Las cpm unidas se grafican como una función de la concentración del análogo o derivado de GLP-1 y se usa el valor de CE₅₀ de la curva de competición como una medida de la afinidad del análogo o derivado por HSA.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una semivida terminal sustancialmente mayor en un modelo de roedor y de no roedor con relación a la liraglutida.

En un aspecto de esta invención, la semivida terminal en roedores o en un modelo no roedor es por lo menos 3 veces mayor en relación con la liraglutida.

5 En otro aspecto de esta invención, la semivida terminal en un modelo no roedor se mejora por lo menos 6 veces en relación con la liraglutida.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una semivida *in vivo* de al menos 10 horas luego de la administración intravenosa a ratas.

10 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene una semivida *in vivo* de al menos 50 h luego de la administración s.c. a minicerdos y preferentemente una semivida *in vivo* de al menos 80 h luego de la administración s.c. a minicerdos.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que se puede formular en partículas adecuadas para la administración pulmonar.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que es física y químicamente estable a pH neutro, más preferentemente en el intervalo 6-8.

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene poca o ninguna tendencia a agregarse. En un aspecto la tendencia a la agregación mejora significativamente en relación con la tendencia a la agregación de la liraglutida cuando fue analizada en un ensayo de tioflavina.

25 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste que es adecuado para la administración pulmonar. Esto puede ser en relación con los aspectos físicos o químicos que son útiles para una formulación pulmonar. Alternativamente, los análogos o derivados son estables frente a la degradación por enzimas en las vías respiratorias y los pulmones.

30 En realizaciones de la invención se logra una combinación de las características anteriores.

La expresión "porción de unión a la albúmina" según se usa en este documento significa un residuo que se une no covalentemente a la seroalbúmina humana. El residuo de unión a la albúmina unido al polipéptido terapéutico tiene habitualmente una afinidad de unión a la albúmina que es inferior a 1 micromolar, preferentemente inferior a 500 nM y aún más preferentemente inferior a 200 nM o incluso inferior a 100 nM.

35 Se conocen una serie de residuos de unión a la albúmina entre moléculas lipófilas lineales y ramificadas que contienen 4-40 átomos de carbono que tienen un grupo ácido distal.

40 La expresión "conector hidrófilo" según se usa en este documento significa un espaciador que separa un péptido y un residuo de unión a la albúmina con una porción química que contiene al menos 5 átomos que no son de hidrógeno de los cuales 30-50% de éstos son N u O.

45 En un aspecto, la invención se refiere a un análogo de GLP-1 o derivado de éste, que contiene un conector hidrófilo entre la secuencia de GLP-1 modificada y uno o más residuos de unión a la albúmina.

En un aspecto, el conector hidrófilo es una porción oligo etilenglicol no ramificada con grupos funcionales adecuados en ambos extremos que forma un puente entre un grupo amino de la secuencia de GLP-1 modificada y un grupo funcional del residuo de unión a la albúmina.

50 En las fórmulas de este documento los enlaces terminales de los grupos unidos se deben considerar como enlaces de unión y no que finalizan en grupos metileno a menos que se indique lo contrario.

En un aspecto de la invención, el análogo o derivado de GLP-1 se elige del grupo constituido por

55 [Glu22,Arg26]GLP-1 (7-33) amida,
 N épsilon20 {2-(2-[2-(2-[2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Val25
 ,Arg26,Leu27,Glu30, Lys33)GLP-1(7-33)amida,
 N épsilon20 {2-(2-[2-(2-[2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
 60 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30) GLP-1(7-
 33)amida,
 [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-33)amida,
 N épsilon20 {2-(2-[2-(2-[2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi)acetilamino]etoxi]etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30) GLP-1(7-

33)amida,
 [Glu22, Arg26]GLP-1(7-33)péptido,
 N épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
 heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil}-[Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Glu30]
 5 GLP-1 (7-33)amida, y
 [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-32)amida.

Formulación

10 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación farmacéutica que contenga un análogo o derivado según la presente invención que esté presente en una concentración de 0.1 mg/ml a 25 mg/ml, y donde dicha formulación tenga un pH de 3.0 a 9.0. La formulación también puede contener un sistema de tampón, conservante(s), agente(s) de tonicidad, quelante(s), estabilizantes y surfactantes.

15 En una realización de la invención, la formulación farmacéutica es una formulación acuosa, es decir una formulación que contiene agua. Dicha formulación es habitualmente una solución o una suspensión.

En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica es una solución acuosa.

20 La expresión "formulación acuosa" se define como una formulación que contiene al menos 50% p/p de agua. Asimismo, la expresión "solución acuosa" se define como una solución que contiene al menos 50% p/p de agua, y la expresión "suspensión acuosa" se define como una suspensión que contiene al menos 50% p/p de agua.

25 En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación liofilizada, en la que el médico o el paciente añade solventes o diluyentes antes de usarla.

En otra realización, la formulación farmacéutica es una formulación seca (por ej. liofilizada o secada por aspersion) pronta para usar sin ninguna disolución previa.

30 En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación farmacéutica compuesta por una solución acuosa de un análogo o derivado según la presente invención y un tampón, donde dicho análogo o derivado está presente en una concentración de 0.1 mg/ml o mayor y donde dicha formulación tiene un pH entre aproximadamente 3.0 y aproximadamente 9.0.

35 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 7.0 y aproximadamente 9.5.
 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 3.0 y aproximadamente 7.0.
 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.5.
 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 7.5 y aproximadamente 9.0.
 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 7.5 y aproximadamente 8.5.
 40 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 7.5.
 En otra realización de la invención, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6.0 y aproximadamente 7.0.
 En otra realización, el pH de la formulación farmacéutica es entre 8.0 y 8.5.

45 En una realización de la invención, cada dosis administrada contiene de 0.01 mg a 10 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene más de 0.05 mg del análogo o derivado activo. En una realización, la dosis administrada contiene más de 0.1 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene hasta 10 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene hasta 9 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene hasta 8 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene hasta 7 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene hasta 6 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene hasta 5 mg del análogo o derivado activo según la invención. En una realización, la dosis administrada contiene de 0.2 mg a 5 mg del análogo o derivado activo según la invención.
 50

55 En otra realización de la invención el tampón se elige del grupo constituido por acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, fosfato ácido de sodio, fosfato disódico, fosfato monosódico, y tris(hidroximetil)-aminometano, bicina, tricina, ácido málico, succinato, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido aspártico o sus mezclas. Cada uno de estos tampones específicos constituye una realización alternativa de la invención.
 60

En otra realización de la invención, la formulación contiene además un conservante farmacéuticamente aceptable. En otra realización de la invención el conservante se elige del grupo constituido por fenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol, p-hidroxibenzoato de metilo, p-hidroxibenzoato de propilo, 2-fenoxietanol, p-hidroxibenzoato de butilo, 2-

feniletanol, alcohol bencílico, clorobutanol y tiomersal, bronopol, ácido benzoico, imidurea, clorhexidina, deshidroacetato de sodio, clorocresol, p-hidroxibenzoato de etilo, cloruro de bencetonio, clorfenesina (3-p-clorfenoxipropano-1,2-diol) o sus mezclas. En una realización, el conservante es fenol o m-cresol. En otra realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 20 mg/ml. En otra realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 0.1 mg/ml y 5 mg/ml. En otra realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 5 mg/ml y 10 mg/ml. En otra realización de la invención el conservante está presente en una concentración entre 10 mg/ml y 20 mg/ml. Cada uno de estos conservantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un conservante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otra realización de la invención, la formulación contiene además un agente isotónico. En otra realización de la invención, el agente isotónico se elige del grupo constituido por una sal (por ej. cloruro de sodio), un azúcar o alcohol de azúcar, un aminoácido (por ej. L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), un alditol (por ej. glicerol (glicerina), 1,2-propanodiol (propilenglicol), 1,3-propanodiol, 1,3-butanodiol) polietilenglicol (por ej. PEG400), o sus mezclas. En una realización, el agente de isotonicidad es propilenglicol. Se puede emplear cualquier azúcar como mono, di, o polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluidas por ejemplo fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, trehalosa, dextrano, pululano, dextrina, ciclodextrina, alfa y beta HPCD, almidón soluble, hidroxietil almidón y carboximetilcelulosa de sodio. En una realización, el aditivo azúcar es sacarosa. El alcohol de azúcar se define como un hidrocarburo C4-C8 que tiene al menos un grupo -OH e incluye, por ejemplo, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización, el aditivo alcohol de azúcar es manitol. Los azúcares o alcoholes de azúcares mencionados antes se pueden utilizar individualmente o en combinación. No existe límite fijo para la cantidad empleada, en tanto el azúcar o el alcohol de azúcar sean solubles en la preparación líquida y no afecten adversamente los efectos estabilizantes logrados utilizando los métodos de la invención. En una realización, la concentración del azúcar o del alcohol de azúcar es entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. En otra realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 50 mg/ml. En otra realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 1 mg/ml y 7 mg/ml. En una realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 5 mg/ml y 7 mg/ml. En otra realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 8 mg/ml y 24 mg/ml. En otra realización de la invención el agente isotónico está presente en una concentración entre 25 mg/ml y 50 mg/ml. Cada uno de estos agentes isotónicos específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un agente isotónico en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otra realización de la invención, la formulación contiene además un quelante. En otra realización de la invención el quelante se elige entre sales del ácido etilendiaminotetracético (EDTA), ácido cítrico, ácido aspártico y sus mezclas. En otra realización de la invención el quelante está presente en una concentración entre 0.1mg/ml y 5 mg/ml. En otra realización de la invención el quelante está presente en una concentración de 0.1 mg/ml a 2 mg/ml. En otra realización de la invención el quelante está presente en una concentración entre 2 mg/ml y 5 mg/ml. Cada uno de estos quelantes específicos constituye una realización alternativa de la invención. El uso de un quelante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

En otra realización de la invención, la formulación contiene además un estabilizante. El uso de un estabilizante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

Más particularmente, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas líquidas estabilizadas cuyos componentes terapéuticamente activos incluyen un polipéptido que presenta posiblemente formación de agregados durante el almacenamiento en formulaciones farmacéuticas líquidas.

Por "formación de agregados" se entiende una interacción física entre las moléculas del polipéptido que resulta en la formación de oligómeros, que pueden permanecer solubles, o grandes agregados visibles que precipitan de la solución. Por "durante el almacenamiento" se entiende una composición o formulación farmacéutica líquida que una vez preparada, no es administrada inmediatamente a un sujeto. Por el contrario, luego de la preparación, se acondiciona para el almacenamiento, ya sea en forma líquida, congelada o en forma seca para su posterior reconstitución en forma líquida o en otra forma adecuada para la administración a un sujeto. Por "forma seca" se entiende que la composición o formulación farmacéutica líquida se seca ya sea mediante secado por congelación (por ej. liofilización; véase, por ejemplo, Williams y Polli (1984) J. Parenteral Sci. Technol. 38:48-59), secado por aspersión (véase Masters (1991) en Spray-Drying Handbook (5ª ed; Longman Scientific and Technical, Essex, Reino Unido), pp. 491-676; Broadhead *et al.* (1992) Drug Devel. Ind. Pharm. 18:1169-1206; y Mumenthaler *et al.* (1994) Pharm. Res. 11:12-20), o secado al aire (Carpenter y Crowe (1988) Cryobiology 25:459-470; y Roser (1991) Biopharm. 4:47-53). La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición

farmacéutica líquida, puede afectar adversamente la actividad biológica de dicho polipéptido, produciendo una pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede causar otros problemas como bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene el polipéptido se administra usando un sistema de infusión.

5 Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden contener además una cantidad de una base de aminoácido suficiente para disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de la composición. Por "base de aminoácido" se entiende un aminoácido o una combinación de aminoácidos, en la que está presente cualquier aminoácido en su forma de base libre o su forma de sal. Cuando se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre en tanto otros están presentes en sus formas de sal. En una realización, los aminoácidos para usar en la preparación de las composiciones de la invención son los que tienen una cadena lateral cargada, como arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Cualquier estereoisómero (es decir, L, D, o una mezcla de ambos) de un aminoácido particular (por ej. metionina, histidina, imidazol, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina y sus mezclas) o combinaciones de estereoisómeros, pueden estar presentes en las composiciones farmacéuticas de la invención siempre que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o en su forma de sal. En una realización se usa el estereoisómero L. Las composiciones de la invención también se pueden formular con análogos de estos aminoácidos. Por "análogo de aminoácido" se entiende un derivado del aminoácido natural que produce el efecto deseado de disminuir la formación de agregados por el polipéptido durante el almacenamiento de las composiciones farmacéuticas líquidas de la invención. Los análogos adecuados de la arginina incluyen, por ejemplo, aminoguanidina, ornitina y N-monoetil L-arginina, los análogos adecuados de la metionina incluyen etionina y butionina y los análogos adecuados de la cisteína incluyen S-metil-L-cisteína. Al igual que con los otros aminoácidos, los análogos de aminoácidos se incorporan en las composiciones ya sea en su forma de base libre como de sal. En otra realización de la invención los aminoácidos o análogos de aminoácidos se usan en una concentración suficiente para evitar o retrasar la agregación de la proteína.

En otra realización de la invención, se puede agregar metionina (u otros aminoácidos o análogos de aminoácidos sulfúricos) para inhibir la oxidación de los residuos de metionina a sulfóxido de metionina cuando el polipéptido que actúa como el agente terapéutico es un polipéptido que contiene al menos un residuo de metionina susceptible a dicha oxidación. Por "inhibir" se entiende la acumulación mínima en el tiempo de especies de metionina oxidada. Inhibir la oxidación de metionina resulta en una mayor retención del polipéptido en su forma molecular apropiada. Se puede usar cualquier estereoisómero de la metionina (L o D) o sus combinaciones. La cantidad a agregar debe ser una cantidad suficiente para inhibir la oxidación de los residuos de metionina de modo que la cantidad de sulfóxido de metionina sea aceptable para los organismos reguladores. Esto significa, generalmente, que la composición no contenga más de aproximadamente 10% a aproximadamente 30% de sulfóxido de metionina. Generalmente, esto se puede lograr agregando metionina de modo que la relación entre la metionina agregada y los residuos de metionina varíe entre aproximadamente 1:1 y aproximadamente 1000:1, por ejemplo entre 10:1 y aproximadamente 100:1.

En otra realización de la invención, la formulación contiene además un estabilizante elegido del grupo de los polímeros de alto peso molecular o compuestos de bajo peso molecular.

En otra realización de la invención, el estabilizante se elige entre: polietilenglicol (por ej. PEG 3350), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, carboxi-/hidroxicelulosa o sus derivados (por ej. H PC, HPC-SL, HPC-L y HPMC), ciclodextrinas, sustancias que contienen azufre como monotioglicerol, ácido tioglicólico y 2-metiltoetanol, y diferentes sales (por ej. cloruro de sodio). Cada uno de estos estabilizantes específicos constituye una realización alternativa de la invención.

[0202] Las composiciones farmacéuticas también pueden contener estabilizantes adicionales, que mejoren aún más la estabilidad de un polipéptido terapéuticamente activo.

Los estabilizantes de particular interés para la presente invención incluyen, pero no exclusivamente, metionina y EDTA, que protegen al polipéptido contra la oxidación de la metionina, y un surfactante no iónico, que protege al polipéptido contra la agregación asociada a la congelación-descongelación o al cizallamiento mecánico.

En otra realización de la invención, la formulación contiene además un surfactante. En otra realización de la invención, la composición farmacéutica contiene dos surfactantes diferentes. El término "surfactante" según se usa en este documento se refiere a cualquier molécula o ión que esté constituido por una parte soluble en agua (hidrófila), la cabeza y un segmento soluble en grasa (lipófilo). Los surfactantes se acumulan preferentemente en las interfases, en las que la parte hidrófila se orienta hacia el agua (fase hidrófila) y la parte lipófila hacia la fase oleosa o hidrófoba (es decir, vidrio, aire, aceite, etc.). La concentración a la cual los surfactantes comienzan a formar micelas se conoce como la concentración micelar crítica o CMC. Además los surfactantes reducen la tensión superficial de un líquido. Los surfactantes se conocen también como compuestos anfipáticos. El término "detergente" es un sinónimo utilizado para los surfactantes en general.

Los surfactantes aniónicos se pueden elegir del grupo de: ácido quenodesoxicólico, sal de sodio del ácido quenodesoxicólico, ácido cólico, ácido deshidrocolico, ácido desoxicólico, éster metílico del ácido desoxicólico, digitonina, digitoxigenina, N,N-dimetildodecilamina N-óxido, docusato sódico, ácido glicoquenodesoxicólico sódico, ácido glicocólico hidratado, ácido glicodesoxicólico monohidratado, sal de sodio del ácido glicodesoxicólico, sal sódica del ácido glicodesoxicólico, sal 3-sulfato disódico del ácido glicolítico, éster etílico del ácido glicolítico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, Lugol, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, 1-butanosulfonato de sodio, 1-decanosulfonato de sodio, 1-dodecanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-heptanosulfonato de sodio, 1-nonanosulfonato de sodio, 1-propanosulfonato de sodio monohidratado, 2-bromoetansulfonato de sodio, colato de sodio hidratado, bilis de buey o de oveja, colato de sodio hidratado, colato de sodio, desoxicolato de sodio, dodecil sulfato de sodio, dodecil sulfato de sodio, hexanosulfonato de sodio, octil sulfato de sodio, pentanosulfonato de sodio, taurocolato de sodio, sal de sodio del ácido tauroquenodesoxicólico, sal de sodio del ácido taurodesoxicólico monohidratada, sal 3-sulfato de sodio del ácido taurolítico, sal de sodio del ácido tauroursodesoxicólico, dodecil sulfato de Trizma® , DSS (docusato de sodio, N° de reg. CAS [577-11-7]), docusato de calcio, N° de reg. CAS [128-49-4]), docusato de potasio, N° de reg. CAS [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o lauril sulfato de sodio), dodecilsulfocolina (FOS-Colina-12), decilsulfocolina (FOS-Choline-10), nonilsulfocolina (FOS-Colina-9), ácido dipalmitoil fosfatídico, caprilato de sodio y/o ácido ursodesoxicólico.

Los surfactantes catiónicos se pueden elegir del grupo constituido por: bromuro de alquiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencildimetilhexadecilamonio, cloruro de bencildimetiltetradecilamonio, tetracloroyodato de benciltrimetilamonio, bromuro de dimetildiodecilamonio, bromuro de dodeciletildimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de etilhexadecildimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, polioxietileno 10-N-sebo-1,3-diaminopropano, bromuro de tonzonio y/o bromuro de trimetil(tetradecil)amonio.

Los surfactantes no iónicos se pueden elegir del grupo de: BigCHAP, Bis(polietilenglicol bis[imidazoil carbonil]), copolímeros en bloque como óxido de polietileno/óxido polipropileno, copolímeros en bloque como poloxámeros, poloxámero 188 y poloxámero 407, Brij® 35, Brij® 56, Brij® 72, Brij® 76, Brij® 92V, Brij® 97, Brij® 58P, Cremophor® EL, decaetilenglicol monododecil éter, N-decanoil-N-metilglucamina, n-dodecanoil-N-metilglucamida, alquilpoliglucósidos, aceite de ricino etoxilado, heptaetilenglicol monododecil éter, heptaetilenglicol monododecil éter, heptaetilenglicol monotetradecil éter, hexaetilenglicol monododecil éter, hexaetilenglicol monohexadecil éter, hexaetilenglicol mono-octadecil éter, hexaetilenglicol monotetradecil éter, Igepal CA-630, Igepal CA-630, metil-6-O-(N-heptilcarbamoil)-beta-D-glucopiranosido, nonaetilenglicol monododecil éter, N-Nonanoil-N-metilglucamina, N-Nonanoil-N-metilglucamina, octaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monododecil éter, octaetilenglicol monohexadecil éter, octaetilenglicol mono-octadecil éter, octaetilenglicol monotetradecil éter, octil-beta-D-glucopiranosido, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monododecil éter, pentaetilenglicol monohexadecil éter, pentaetilenglicol monohexil éter, pentaetilenglicol mono-octadecil éter, pentaetilenglicol mono-octil éter, polietilenglicol diglicidil éter, polietilenglicol éter W-1, polioxietileno 10 tridecil éter, estearato de polioxietileno 100, polioxietileno 20 isohexadecil éter, polioxietileno 20 oleil éter, estearato de polioxietileno 40, estearato de polioxietileno 50, estearato de polioxietileno 8, polioxietileno bis(imidazoil carbonil), estearato de polioxietileno 25 propilenglicol, saponina de corteza de Quillay, Span® 20, Span® 40, Span® 60, Span® 65, Span® 80, Span® 85, Tergitol, tipo 15-S-12, Tergitol, tipo 15-S-30, Tergitol, tipo 15-S-5, Tergitol, tipo 15-S-7, Tergitol, tipo 15-S-9, Tergitol, tipo NP-10, Tergitol, tipo NP-4, Tergitol, tipo NP-40, Tergitol, tipo NP-7, Tergitol, tipo NP-9, tetradecil-beta-D-maltósido, tetraetilenglicol monododecil éter, tetraetilenglicol monododecil éter, tetraetilenglicol monotetradecil éter, trietilenglicol monododecil éter, trietilenglicol monododecil éter, trietilenglicol monohexadecil éter, trietilenglicol mono-octil éter, trietilenglicol monotetradecil éter, Triton CF-21, Triton CF-32, Triton DF-12, Triton DF-16, Triton GR-5M, Triton QS-15, Triton QS-44, Triton X-100, Triton X-102, Triton X-15, Triton X-151, Triton X-200, Triton X-207, Triton® X-100, Triton® X-114, solución de Triton® X-165, solución de Triton® X-305, Triton® X-405, Triton® X-45, Triton® X-705-70, TWEEN® 20, TWEEN® 40, TWEEN® 60, TWEEN® 6, TWEEN® 65, TWEEN® 80, TWEEN® 81, TWEEN® 85, Tiloxapol, esfingofosfolípidos (esfingomielina), y esfingoglucolípidos (ceramidas, gangliósidos), fosfolípidos y/o n-undecil beta-D-glucopiranosido.

Los surfactantes zwitteriónicos se pueden elegir del grupo de: CHAPS, CHAPSO, sal interna de 3-(decildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(dodecildimetilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilmiristilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetiloctadecilamonio)propanosulfonato, sal interna de 3-(N,N-dimetiloctilamonio)propanosulfonato, 3-(N,N-dimetilpalmitilamonio)propanosulfonato, N-alkuil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonato, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, dodecilsulfocolina, miristoil lisofosfatidilcolina, Zwittergent 3-12 (N-dodecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato), Zwittergent 3-10 (sal interna de 3-(decildimetil-amonio)propanosulfonato), Zwittergent 3-08 (3-(octildimetil-amonio)propanosulfonato), glicerofosfolípidos (lecitinas, cefalinas, fosfatidilserina), gliceroglucolípidos (galactopiranosido), derivados alquil, alcoxil (alquil éster), alcoxi (alquil éter) de lisofosfatidil y fosfatidilcolina, por ej. derivados lauroil y miristoil de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfatídico, serinas, treoninas, glicerol, inositol,

5 lisofosfatidilserina y lisofosfatidilreonina, acilcarnitinas y derivados, derivados N^β-acilados de lisina, arginina o histidina, o derivados de cadena lateral acilada de lisina o arginina, derivados N^β-acilados de dipéptidos que contengan cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivados N^β-acilados de tripéptidos que contengan cualquier combinación de un aminoácido neutro o dos aminoácidos cargados, o el surfactante se puede elegir del grupo de los derivados de imidazolina, ácidos grasos de cadena larga y sus sales C₆-C₁₂ (por ej. ácido oleico y ácido caprílico), N-Hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, surfactantes aniónicos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos), palmitoil lisofosfatidil-L-serina, lisofosfolípidos (por ej. ésteres 1-acil-sn-glicero-3-fosfato de etanolamina, colina, serina o treonina), o sus mezclas.

10 El término "alquil-poliglucósidos" según se usa en este documento se refiere a una cadena C₅₋₂₀-alquilo, -alquenoilo o -alquínilo lineal o ramificada que está sustituida con una o más porciones glucósido como maltósido, sacárido, etc. Las realizaciones de estos alquil-poliglucósidos incluyen C₆₋₁₈-alquil-poliglucósidos. Las realizaciones específicas de estos alquil-poliglucósidos incluyen las cadenas de número par de carbonos como las cadenas alquilo C₆, C₈, C₁₀,
15 C₁₂, C₁₄, C₁₆, C₁₈ y C₂₀. Realizaciones específicas de las porciones glucósido incluyen piranosido, glucopiranosido, maltósido, maltotriósido y sacarosa. En realizaciones de la invención, menos de 6 porciones glucósido están unidas al grupo alquilo. En realizaciones de la invención, menos de 5 porciones glucósido están unidas al grupo alquilo. En realizaciones de la invención, menos de 4 porciones glucósido están unidas al grupo alquilo. En realizaciones de la invención, menos de 3 porciones glucósido están unidas al grupo alquilo. En realizaciones de la invención, menos de 2 porciones glucósido están unidas al grupo alquilo. Realizaciones específicas de alquil-poliglucósidos son alquil glucósidos n-decil β-D-glucopiranosido, decil β-D-maltopiranosido, dodecil β-D-glucopiranosido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, n-dodecil β-D-maltósido, tetradecil β-D-glucopiranosido, decil β-D-maltósido, hexadecil β-D-maltósido, decil β-D-maltotriósido, dodecil β-D-maltotriósido, tetradecil β-D-maltotriósido, hexadecil β-D-maltotriósido, n-dodecil-sacarosa, n-decil-sacarosa, monocaprato de sacarosa, monolaurato de sacarosa, monomiristato de sacarosa y monopalmitato de sacarosa.

25 El uso de un surfactante en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, 1995.

30 En otra realización de la invención, la formulación contiene además inhibidores de proteasas como EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y benzamidina HCl, pero también se pueden utilizar otros inhibidores de proteasas disponibles en el comercio. El uso de un inhibidor de proteasas es particularmente útil en composiciones farmacéuticas que contienen zimógenos de proteasas para inhibir la autocatálisis.

35 Es posible que estén presentes otros ingredientes en la formulación farmacéutica del péptido de la presente invención. Dichos ingredientes adicionales pueden incluir humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, modificadores de la tonicidad, quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ej. seroalbúmina humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión (por ej. un aminoácido como betaina, taurina, arginina, glicina, lisina e histidina). Dichos ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

40 Las composiciones farmacéuticas que contienen un análogo o derivado según la invención se pueden administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento en varios sitios, por ejemplo, tópicamente, por ejemplo, en sitios de la piel y la mucosa, en sitios que eluden la absorción, por ejemplo, la administración en una arteria, en una vena, en el corazón y en sitios que implican absorción, por ejemplo, la administración en la piel, debajo de la piel en un músculo o en el abdomen.

45 La administración de composiciones farmacéuticas según la invención se puede realizar a través de varias vías de administración, por ejemplo, lingual, sublingual, bucal, en la boca, oral, en el estómago y los intestinos, nasal, pulmonar, por ejemplo, a través de los bronquiolos y alveolos o una combinación de éstas, epidérmica, dérmica, transdérmica, vaginal, rectal, ocular, por ejemplo a través de la conjuntiva, ureteral y parenteral a pacientes que necesitan dicho tratamiento.

50 Las composiciones de la presente invención se pueden administrar en varias formas farmacéuticas, por ejemplo como soluciones, suspensiones, emulsiones, microemulsiones, emulsión múltiple, espumas, pomadas, pastas, yesos, ungüentos, comprimidos, comprimidos recubiertos, goma de mascar, enjuagues, cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina blanda y cápsulas de gelatina dura, supositorios, cápsulas rectales, gotas, geles, atomizaciones, polvos, aerosoles, inhalantes, gotas oculares, ungüentos oftálmicos, enjuagues oftálmicos, pesarios vaginales, anillo vaginales, ungüentos vaginales, solución de inyección, soluciones que se transforman in situ, por ejemplo gelificación in situ, solidificación *in situ*, precipitación in situ, cristalización in situ, solución de infusión e
60 implantantes. Las composiciones de la invención también se pueden combinar con, o unir a, por ejemplo a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un portador farmacéutico, un sistema de administración del fármaco y un sistema de administración del fármaco avanzado para mejorar aún más la estabilidad del análogo o derivado de la presente invención, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, lograr la cronoterapia bien conocida por los expertos y aumentar la obediencia del paciente, o cualquier

combinación de éstos. Los ejemplos de portadores, sistemas de administración del fármaco y sistemas de administración del fármaco avanzados incluyen, pero no exclusivamente, polímeros, por ejemplo celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo dextrano y derivados, almidón y derivados, poli (vinil alcohol), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros en bloque de ellos, polietilenglicoles, proteínas portadoras, por ejemplo albúmina, geles, por ejemplo, sistemas de termogelificación, por ejemplo sistemas de copolímeros en bloque bien conocidos por los expertos, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y sus dispersiones, fase L2 y sus dispersiones, bien conocidas por los expertos en el comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsión, automicroemulsión, ciclodextrinas y sus derivados, y dendrímeros.

Las composiciones de la presente invención son útiles en la formulación de sólidos, semisólidos, polvos y soluciones para la administración pulmonar de un análogo o derivado según la invención, empleando, por ejemplo un inhalador de dosis fija, un inhalador de polvo seco y un nebulizador, todos dispositivos bien conocidos en el área.

Las composiciones de la invención actual, son específicamente útiles en la formulación de sistemas de administración de fármacos de liberación controlada, sostenida, prolongada, retardada y lenta. Más específicamente, pero no exclusivamente, las composiciones son útiles en la formulación de sistemas de liberación parenteral controlada y sistemas de liberación sostenida (ambos sistemas conducen a una reducción en muchas veces de la cantidad de administraciones), bien conocidos por los expertos en el área. Aún más preferentemente, son sistemas de liberación controlada y de liberación sostenida administrados por vía subcutánea. Sin limitar el alcance de la invención, los ejemplos de sistemas de liberación controlada y composiciones útiles son los hidrogeles, los geles oleaginosos, los cristales líquidos, las micelas poliméricas, las microesferas y las nanopartículas.

Los métodos para producir sistemas de liberación controlada útiles para las composiciones de la invención actual incluyen, pero no exclusivamente, cristalización, condensación, co-cristalización, precipitación, co-precipitación, emulsión, dispersión, homogeneización a alta presión, encapsulación, secado por aspersion, microencapsulación, coacervación, separación de fases, evaporación del solvente para producir microesferas, extrusión y procesos de fluido supercrítico. Se hace referencia general a Handbook of Pharmaceutical Controlled Release (Wise, D.L., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000) y Drug and the Pharmaceutical Sciences vol. 99: Protein Formulation and Delivery (MacNally, E.J., ed. Marcel Dekker, Nueva York, 2000).

La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de lapicera. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Otra opción es una composición que puede ser una solución o una suspensión o un polvo para la administración del análogo o derivado de la presente invención en formar de un aerosol líquido o de polvo nasal o pulmonar. Como otra opción más, las composiciones farmacéuticas que contienen el análogo o derivado según la invención también se pueden adaptar a la administración transdérmica, por ej. mediante inyección sin aguja o desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o administración transmucosa, por ej. bucal.

Los análogos o derivados según la presente invención se pueden administrar por vía pulmonar en un vehículo, como una solución, suspensión o polvo seco empleando cualquiera de los tipos conocidos de dispositivos adecuado para la administración pulmonar de un fármaco. Los ejemplos de estos comprenden, pero no exclusivamente, los tres tipos generales de generadores de aerosol para la administración pulmonar de un fármaco, y pueden incluir nebulizadores de chorro o ultrasónicos, inhaladores de dosis fija, o inhaladores de polvo seco (Cf. Yu J, Chien YW. Pulmonary drug delivery: Physiologic and mechanistic aspects. Crit Rev Ther Drug Carr Sys 14(4) (1997) 395-453).

Basándose en la metodología de análisis estandarizada, el diámetro aerodinámico (d_a) de una partícula se define como el diámetro geométrico equivalente de una partícula esférica estándar de referencia que tiene la densidad de una unidad (1 g/cm^3). En el caso más simple, para las partículas esféricas, d_a está relacionado con un diámetro de referencia (d) como una función de la raíz cuadrada de la relación de densidad según lo descrito por:

Ocurren modificaciones a esta relación para partículas no esféricas (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). Los términos "MMAD" y "MMEAD" están bien descritos y son conocidos en el área (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R y representan una medida del valor medio de la distribución de tamaño de partículas aerodinámicas. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El diámetro aerodinámico de masa media (MMAD) y el diámetro aerodinámico de masa media eficaz (MMEAD) se usan indistintamente, son parámetros estadísticos, y describen empíricamente el tamaño de las partículas de aerosol en relación con su potencial para depositarse en los pulmones, independientemente de su forma, tamaño o densidad reales (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer R. Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385). El MMAD se calcula normalmente a partir de las mediciones hechas con impactadores, un instrumento que mide el comportamiento inercial de la partícula en el aire.

En otra realización, la formulación pudo ser aerosolizada por cualquier tecnología de aerosolización conocida, como la nebulización, para lograr un MMAD de las partículas del aerosol menor de 10 μm , más preferentemente entre 1-5 μm , y muy preferentemente entre 1-3 μm . El tamaño de partícula preferido se basa en el tamaño más eficaz para la administración del fármaco a la parte profunda del pulmón, donde la proteína es absorbida óptimamente (cf. Edwards DA, Ben-Jebria A, Langer A, Recent advances in pulmonary drug delivery using large, porous inhaled particles. J Appl Physiol 84(2) (1998) 379-385).

El depósito de las formulaciones pulmonares que contienen el análogo o derivado según la presente invención en la zona profunda del pulmón puede ser optimizado aún más, opcionalmente, empleando modificaciones de las técnicas de inhalación, por ejemplo, pero no exclusivamente: flujo de inhalación lento (por ej. 30 L/min), retención de la respiración y tiempo de actuación.

La expresión "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química.

El término "estabilidad física" de la formulación de proteína según se usa en este documento se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados biológicamente inactivos y/o insolubles de la proteína, como resultado de la exposición de la proteína a tensiones termomecánicas y/o interacción con las interfases y las superficies que son desestabilizantes, como las superficies e interfases hidrofóbicas. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteína se evalúa mediante inspección visual y/o mediciones de turbidez, después de exponer la formulación acondicionada en recipientes adecuados (por ej. cartuchos o viales) a estrés mecánico o físico (por ej. agitación) a diferentes temperaturas durante diversos períodos de tiempo. La inspección visual de las formulaciones se realiza en una luz fuerte enfocada, con un fondo oscuro. La turbidez de la formulación se caracteriza por una puntuación visual que clasifica el grado de turbidez por ejemplo en una escala de 0 a 3 (una formulación que no presenta turbidez corresponde a una puntuación visual de 0 y una formulación que presenta turbidez visual a la luz del día corresponde a una puntuación visual de 3). Una formulación se clasifica como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteína, cuando presenta turbidez visual a la luz del día. Alternativamente, la turbidez de la formulación se puede evaluar mediante mediciones simples de turbidez conocidas por los expertos. La estabilidad física de las formulaciones acuosas de proteínas también se puede evaluar mediante el uso de un agente espectroscópico o sonda del estado conformacional de la proteína. La sonda es preferentemente una molécula pequeña que de preferencia se une a un conformero no natural de la proteína. Un ejemplo de una sonda molecular espectroscópica pequeña de la estructura de la proteína es tioflavina T. La tioflavina T es una tintura fluorescente que ha sido utilizada ampliamente para la detección de fibrillas amiloides. En presencia de fibrillas y tal vez de otras configuraciones de proteínas, la tioflavina T da lugar a un nuevo máximo de excitación aproximadamente a 450 nm y una emisión potenciada aproximadamente a 482 nm cuando se une a una forma de proteína fibrilar. La tioflavina T sin unir es esencialmente no fluorescente a esas longitudes de onda.

Otras moléculas pequeñas se pueden utilizar como sondas de los cambios en la estructura de la proteína de estados naturales a no naturales. Por ejemplo las sondas "parche hidrófobo" que se unen preferentemente a parches hidrófobos expuestos de una proteína. Los parches hidrófobos generalmente están enterrados dentro de la estructura terciaria de una proteína en su estado natural, pero quedan expuestos cuando una proteína comienza a desplegarse o desnaturalizarse. Los ejemplos de estas sondas moleculares espectroscópicas pequeñas, son tinturas aromáticas, hidrófobas, como antraceno, acridina, fenantrolina o similares. Otras sondas espectroscópicas son complejos metal-aminoácido, como complejos metálicos de cobalto de aminoácidos hidrófobos, como fenilalanina, leucina, isoleucina, metionina y valina, o similares.

La expresión "estabilidad química" de la formulación de proteína según se usa en este documento se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con posible menor potencia biológica y/o posibles mayores propiedades inmunógenas en comparación con la estructura de la proteína natural. Dependiendo del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del medio ambiente al que está expuesta la proteína, se pueden formar diversos productos de degradación química. La eliminación de la degradación química puede probablemente no ser evitada completamente y a menudo se observan cantidades crecientes de productos de degradación química durante el almacenamiento y uso de la formulación de la proteína como bien saben los expertos. La mayoría de las proteínas es propensa a la desamidación, un proceso en el cual se hidroliza el grupo amida de la cadena lateral en residuos de glutaminilo o asparraginilo para formar un ácido carboxílico libre. Otras vías de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de la proteína se unen covalentemente entre sí a través de transamidación y/o interacciones disulfuro que dan lugar a la formación de productos de degradación diméricos, oligoméricos y poliméricos unidos covalentemente (Stability of Protein Pharmaceuticals, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York 1992). La oxidación (por ejemplo de los residuos de metionina) se puede mencionar como otra variante de degradación química. La estabilidad química de la formulación de proteína se puede evaluar midiendo la cantidad de productos de degradación química en diversos momentos después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (a menudo la formación de productos de degradación puede ser

acelerada por ejemplo aumentando la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación se determina a menudo por separación de los productos de degradación dependiendo del tamaño y/o la carga de la molécula, empleando diversas técnicas cromatográficas (por ej. SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

5 Por consiguiente, como se señaló antes, una "formulación estabilizada" se refiere a una formulación con mayor estabilidad física, mayor estabilidad química o mayor estabilidad física y química. En general, una formulación debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de conformidad con las condiciones de uso y almacenamiento recomendadas) hasta la fecha de vencimiento.

10 En una realización de la invención, la formulación farmacéutica que contiene el análogo o derivado según la presente invención es estable durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que contiene el análogo o derivado según la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

15 En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que contiene el análogo o derivado según la presente invención es estable durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

20 Aún en otra realización de la invención, la formulación farmacéutica que contiene el análogo o derivado según la presente invención es estable durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un análogo o derivado según la invención para la preparación de un medicamento.

25 En una realización, un análogo o derivado según la presente invención se utiliza para la preparación de un medicamento para el tratamiento o la prevención de: hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, síndrome de enfermedad inflamatoria intestinal, dispepsia y úlceras gástricas.

30 En otra realización, un análogo o derivado según la presente invención se utiliza para la preparación de un medicamento destinado a retrasar o prevenir el avance de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

35 En otra realización, un análogo o derivado según la presente invención se utiliza para la preparación de un medicamento para disminuir el consumo de alimentos, disminuir la apoptosis de células β , aumentar la función de las células β y la masa de células β , y/o para restaurar la sensibilidad de la glucosa a las células β .

El tratamiento con un análogo o derivado según la presente invención también se puede combinar con un segundo o más principios farmacológicamente activos, por ej. elegidos entre antidiabéticos, agentes antiobesidad, reguladores del apetito, antihipertensivos, agentes para el tratamiento o la prevención de las complicaciones resultantes de la diabetes o asociadas a ella y agentes para el tratamiento y/o la prevención de complicaciones y trastornos resultantes de la obesidad o asociados a ella. Los ejemplos de estos principios farmacológicamente activos son: insulina, sulfonilureas, biguanidas, meglitinidas, inhibidores de la glucosidasa, antagonistas de glucagón, inhibidores de la DPP-IV (dipeptidil peptidasa-IV), inhibidores de las enzimas hepáticas involucradas en la estimulación de la gluconeogénesis y/o la glucogenólisis, moduladores de la absorción de glucosa, compuestos que modifican el metabolismo lipídico, como compuestos antihiperlipidémicos por ejemplo inhibidores de la HMG CoA (estatinas), polipéptidos inhibidores gástricos (análogos de GIP), compuestos que disminuyen el consumo de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β ; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina, neteglinida, repaglinida; β -bloqueantes como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, inhibidores de ACE (enzima convertidora de angiotensina) como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores del canal del calcio como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamilo y α -bloqueantes como doxazosina, urapidilo, prazosina y terazosina; agonistas de CART (transcrito regulado por la cocaína y la Anfetamina), antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de PYY, agonistas del receptor de Y2, agonistas del receptor de Y4, agonistas mixtos del receptor de Y2/Y4, agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína de unión al factor de liberación de corticotropina), agonistas de la urocortina, agonistas β 3, oxintomodulina y análogos, agonistas de MSH (hormona estimulante de los melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de la recaptación de serotonina, inhibidores de la recaptación de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos serotoninérgicos y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de la bombesina, antagonistas de la galanina, hormona de crecimiento, compuestos liberadores de la hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tirotrópina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína desacopladora 2 o 3), agonistas de la leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de la

lipasa/amilasa, moduladores RXR (receptor retinoide X), agonistas TR β ; antagonistas de la histamina H3, agonistas o antagonistas del polipéptido inhibidor gástrico (análogos de GIP), gastrina y análogos de la gastrina.

5 El tratamiento con un análogo o derivado según la presente invención también se puede combinar con cirugía, una cirugía que influya en los niveles de glucosa y/o la homeostasis lipídica como la banda gástrica o el by-pass gástrico.

Se debe entender que cualquier combinación adecuada de los análogos o derivados según la presente invención con uno o más de los compuestos mencionados antes y opcionalmente uno o más de otros principios farmacológicamente activos se considera comprendida por el alcance de la presente invención.

10 Método de fabricación de los análogos

Dependiendo de la secuencia los análogos de esta invención se pueden producir mediante un método que consiste en por cultivar una célula huésped que contenga una secuencia de ADN que codifique el polipéptido y capaz de expresar el polipéptido en un medio nutritivo adecuado en las condiciones que permiten la expresión del péptido, tras lo cual se recupera el péptido resultante del cultivo.

20 El medio utilizado para el cultivo de las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para multiplicar las células huésped, como medios mínimos o complejos que contengan los complementos adecuados. Los medios adecuados se pueden adquirir a proveedores comerciales o se pueden preparar según fórmulas publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection). El péptido producido por las células se puede recuperar después del medio de cultivo mediante procedimientos convencionales que incluyen la separación de las células huésped del medio por centrifugación o filtración, la precipitación de los componentes proteicos del sobrenadante o del filtrado por medio de una sal, por ejemplo, sulfato de amonio, la purificación por diversos procedimientos cromatográficos, por ej., cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares, dependiendo del tipo de péptido en cuestión.

30 La secuencia de ADN que codifica el polipéptido terapéutico puede ser adecuadamente de ADN genómico o ADNc, obtenido por ejemplo preparando una genoteca de ADN genómico o ADNc y detectando las secuencias de ADN que codifican todo o parte del polipéptido mediante hibridación con sondas de oligonucleótidos sintéticos de conformidad con las técnicas estándar (véase, por ejemplo, Sambrook, J, Fritsch, EF and Maniatis, T, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, 1989). La secuencia de ADN que codifica el polipéptido también se puede preparar sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de la fosfoamidita descrito por Beaucage y Caruthers, Tetrahedron Letters 22 (1981), 1859 - 1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, EMBO Journal 3 (1984), 801-805. La secuencia de ADN también se puede preparar mediante reacción en cadena de la polimerasa empleando cebadores específicos, por ejemplo como los descritos en US 4,683,202 o por Saiki *et al.*, Science 239 (1988), 487 - 491.

40 La secuencia de ADN se puede insertar en cualquier vector que pueda ser sometido convenientemente a procedimientos de recombinación del ADN, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula huésped en el cual se va a introducir. Por lo tanto, el vector puede ser un vector que se replica autónomamente, es decir, un vector, que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en una célula huésped, se integra en el genoma de la célula huésped y se replica junto con el cromosoma o los cromosomas en los que ha sido integrado.

50 El vector es preferentemente un vector de expresión en el que la secuencia de ADN que codifica el péptido está unida operablemente a segmentos adicionales necesarios para la transcripción del ADN, como un promotor. El promotor puede ser cualquier secuencia de ácido nucleico que tenga actividad transcripcional en la célula huésped de elección y se pueda derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción del ADN que codifica el péptido de la invención en diversas células huésped son muy conocidos en el área, cf. por ejemplo Sambrook *et al.*, supra.

55 La secuencia de ADN que codifica el péptido también puede, si es necesario, ser conectada operablemente a un terminador adecuado, señales de poliadenilación, secuencias potenciadoras de la transcripción y secuencias potenciadoras de la traducción. El vector recombinante de la invención puede además contener una secuencia de ADN que permita al vector replicarse en la célula huésped en cuestión.

60 El vector también puede contener un marcador seleccionable, por ejemplo un gen cuyo producto complemente un defecto en la célula huésped o uno que le confiera resistencia a un fármaco, por ej. ampicilina, kanamicina, tetraciclina, cloranfenicol, neomicina, higromicina o metotrexato.

Para dirigir un péptido original de la presente invención a la vía secretora de las células huésped, se debe proporcionar una secuencia señal secretora (también conocida como una secuencia líder, prepro secuencia o pre

5 secuencia) en el vector recombinante. La secuencia señal secretora se une a la secuencia de ADN que codifica el péptido en el marco de lectura correcto. Las secuencias señal secretoras comúnmente se ubican 5' respecto a la secuencia de ADN que codifica el péptido. La secuencia señal secretora puede ser la que normalmente se asocia al péptido o puede ser de un gen que codifica otra proteína segregada. Los procedimientos usados para ligar las secuencias de ADN que codifican el péptido de la presente, el promotor y opcionalmente el terminador y/o la secuencia de señal secretora, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son conocidos por los expertos en el área (cf., por ejemplo, Sambrook *et al.*, supra).

10 La célula huésped en la cual se introduce la secuencia de ADN o el vector recombinante puede ser cualquier célula que sea capaz de producir el péptido de la presente e incluye bacterias, levaduras, hongos y células eucariotas superiores. Los ejemplos de células huésped adecuadas conocidas y usadas en el área son, sin limitación, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* o líneas celulares BHK o CHO de mamíferos.

15 Realizaciones según la invención

20 1. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste que comprende una secuencia de GLP-1 7-35 (SEQ ID N° 1) modificada que tiene:

- 25 i) un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, incluidas
 a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 1, y
 b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 1,
 ii) opcionalmente el aminoácido o los aminoácidos en una posición equivalente a la posición 30, 31, 32, 33, 34 o 35 de SEQ ID N° 1 pueden estar ausentes siempre que si el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33 o 34 está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente, y
 iii) opcionalmente un grupo amida C-terminal.

30 2. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 1, que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila.

35 3. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que el aminoácido en la posición 35 está ausente, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 28 aminoácidos.

40 4. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 27 aminoácidos.

45 5. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 26 aminoácidos.

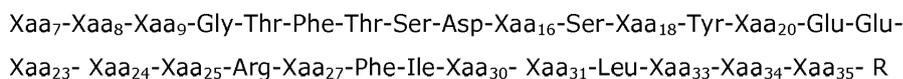
6. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 25 aminoácidos.

7. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 24 aminoácidos.

50 8. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 30, 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 23 aminoácidos.

55 9. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-8 que tiene un grupo amida C-terminal.

10. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene la secuencia de fórmula (I)



60 Fórmula (I) (SEQ ID No: 2)

en la que

Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

5 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;

Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu como alfa,alfa-dimetil-Glu;

Xaa₁₆ es Val o Leu;

Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;

10 Xaa₂₀ es Leu, Lys o Cys;

Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;

Xaa₂₄ es Ala o Asn;

Xaa₂₅ es Ala o Val;

Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;

15 Xaa₃₀ es Ala, Glu, Arg o está ausente;

Xaa₃₁ es Trp, Lys, Cys o está ausente;

Xaa₃₃ es Val, Lys, Cys o está ausente;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente;

Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;

20 R es amida o está ausente;

siempre que si Xaa₃₀, Xaa₃₁, Xaa₃₂, Xaa₃₃ o Xaa₃₄ está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.

25 11. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene la secuencia de fórmula (II)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-

Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R

Formula (II) (SEQ ID No: 3)

en la que

Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

30 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;

Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;

Xaa₃₀ es Ala, Glu, Arg o está ausente;

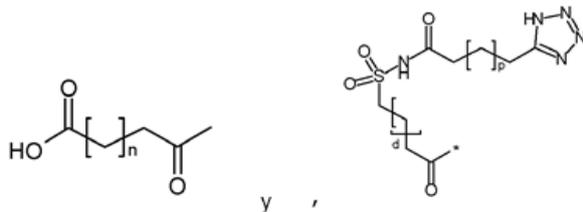
35 Xaa₃₃ es Val, Lys o está ausente;

Xaa₃₄ es Lys, Glu, Arg o está ausente;

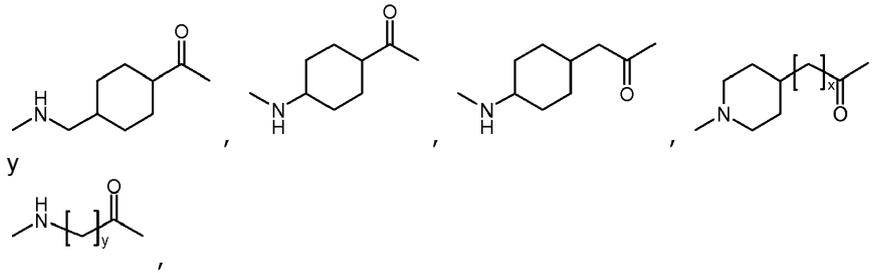
Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;

R es amida o está ausente;

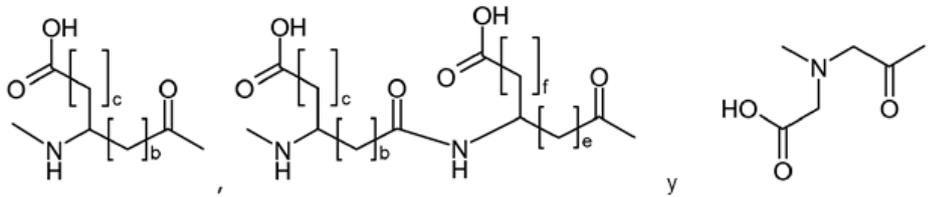
40 12. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-11, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D- en el que A- se elige del grupo constituido por:



45 en el que n se elige del grupo constituido por 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se elige del grupo constituido por 10, 11, 12, 13 y 14, y d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5, -B- se elige del grupo constituido por

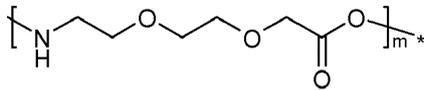
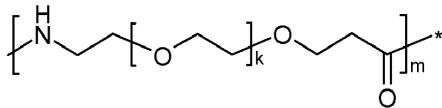


5 donde x se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, e y se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,
-C- se elige del grupo constituido por

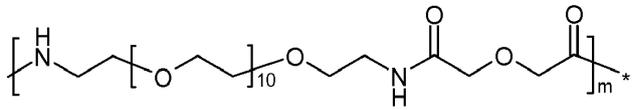
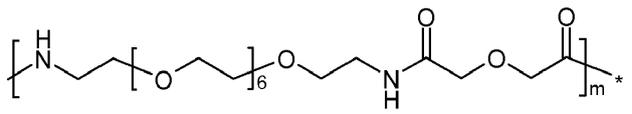


10 donde b y e se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2, y c y f se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2 con la condición de que b sea 1 o 2 cuando c es 0, o que b sea 0 cuando c es 1 o 2, y e sea 1 o 2 cuando f es 0, o e sea 0 cuando f es 1 o 2, y
- D- está unido al residuo de dicho aminoácido y es un conector.

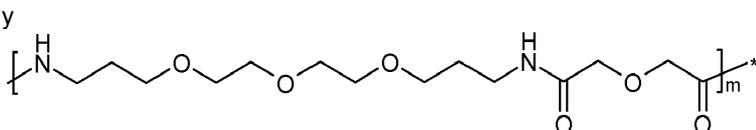
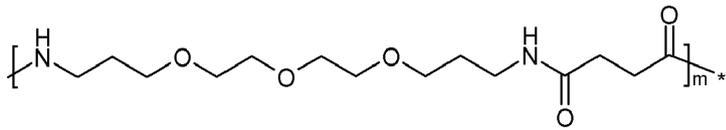
15 13. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 12, en el que D se elige del grupo constituido por



20



25



30

y donde k se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

14. Una composición farmacéutica que contiene un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 15. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-14 para utilizar en el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

10 La secuencia de aminoácidos de GLP-1(7-35) humano se incluye en el listado de secuencias como SEQ ID N° 1, y SEQ ID N° 2 y 3 son derivados de éste según la invención.

15 En el listado de secuencias la numeración comienza con el residuo de aminoácido N° 1. Concordantemente, por ej., la posición 1 de SEQ ID N° 1 es equivalente a la posición 7 de GLP-1(7-35) (His), la posición 16 de SEQ ID N° 1 es equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-35) (Gly) y la posición 20 de SEQ ID N° 1 es equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-35) (Lys) -y vice versa para las otras posiciones y las otras secuencias.

20 Concordantemente, la invención también proporciona en la realización 1 anterior, un análogo o derivado de GLP-1 que comprende una secuencia de GLP-1(7-35) modificada que tiene:

20 i) un total de 2, 3, 4, 5 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de SEQ ID N° 1, incluidas

25 a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-35) (posición 16 de SEQ ID N° 1), y
 b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-35) (posición 20 de SEQ ID N° 1),
 ii) opcionalmente los aminoácidos en una posición equivalente a la posición 30, 31, 32, 33, 34 o 35 de GLP-1(7-35) (posición 24, 25, 26, 27, 28 o 29, respectivamente, de SEQ ID N° 1) pueden estar ausentes siempre que si el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33 o 34 de GLP-1(7-35) (posiciones 24, 25, 26, 27 o 28 de SEQ ID N° 1) está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente, y
 iv) opcionalmente un grupo amida C-terminal.

30 La invención proporciona además análogos o derivados de GLP-1, métodos y usos de éstos, y composiciones farmacéuticas con un contenido de éstos correspondiente a cualquiera de las realizaciones anteriores y realizaciones particulares según la invención, en las cuales las enmiendas en la numeración de la posición correspondiente se hicieron como se explicó antes, y se muestran antes para el análogo o derivado de GLP-1 de la realización 1 anterior.

35 1. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste que comprende una secuencia de GLP-1 7-35 (SEQ ID N° 1) modificada que tiene:

40 i) un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, incluidas

45 a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 1, y
 b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 1,
 ii) opcionalmente el aminoácido o los aminoácidos en una posición equivalente a la posición 30, 31, 32, 33, 34 o 35 de SEQ ID N° 1 pueden estar ausentes siempre que si el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33 o 34 está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente, y
 iii) opcionalmente un grupo amida C-terminal.

50 2. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 1, que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila.

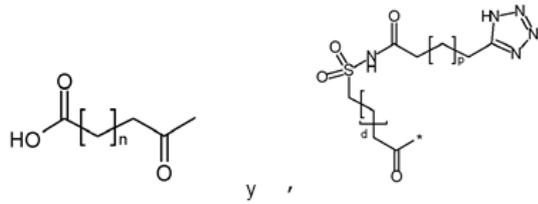
55 3. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que el aminoácido en la posición 35 está ausente, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 28 aminoácidos.

4. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 27 aminoácidos.

60 5. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 26 aminoácidos.

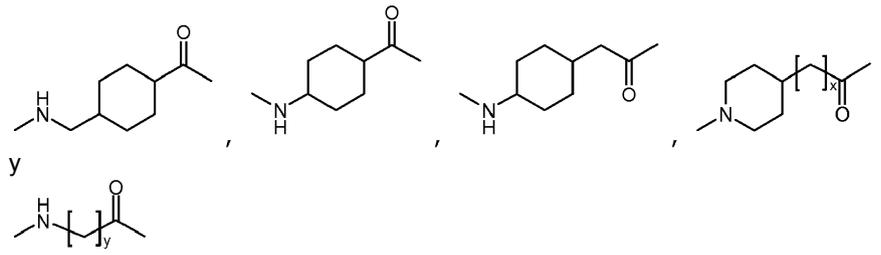
6. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 25 aminoácidos.

7. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 24 aminoácidos.
- 5 8. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 30, 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 23 aminoácidos.
- 10 9. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-8 que tiene un grupo amida C-terminal.
10. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene la secuencia de fórmula (I)
- Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-
Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀- Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R
- Formula (I) (SEQ ID No: 2)
- 15 en la que
- Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o
- 20 ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu como alfa,alfa-dimetil-Glu;
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₀ es Leu, Lys o Cys;
- 25 Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₄ es Ala o Asn;
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
- 30 Xaa₃₁ es Trp, Lys, Cys o está ausente;
- Xaa₃₃ es Val, Lys, Cys o está ausente;
- Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente;
- Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
- R es amida o está ausente;
- 35 siempre que si Xaa₃₀, Xaa₃₁, Xaa₃₂, Xaa₃₃ o Xaa₃₄ está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.
11. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene la secuencia de fórmula (II) Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-Glu-Phe-Ile-
- 40 Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R Formula (II) (SEQ ID N°: 3)
- en la que
- Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- 45 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
- Xaa₃₃ es Val, Lys o está ausente;
- 50 Xaa₃₄ es Lys, Glu, Arg o está ausente;
- Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
- R es amida o está ausente;
12. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-11, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-
- 55 en el que A- se elige del grupo constituido por:



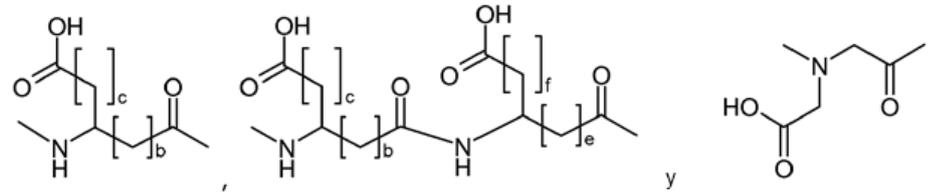
en el que n se elige del grupo constituido por 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se elige del grupo constituido por 10, 11, 12, 13 y 14, y d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

5 -B- se elige del grupo constituido por



10 donde x se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, e y se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

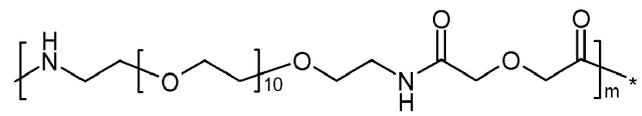
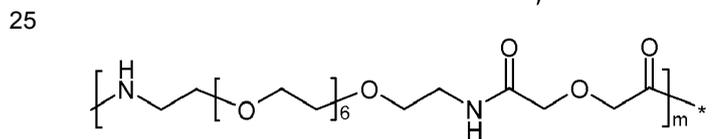
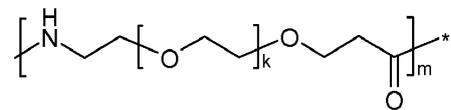
-C- se elige del grupo constituido por

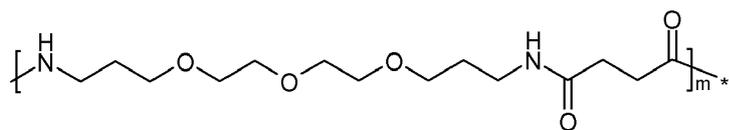


15 donde b y e se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2, y c y f se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2 con la condición de que b sea 1 o 2 cuando c es 0, o que b sea 0 cuando c es 1 o 2, y e sea 1 o 2 cuando f es 0, o e sea 0 cuando f es 1 o 2, y

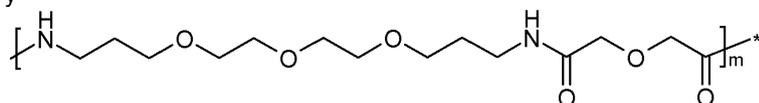
20 - D- está unido al residuo de dicho aminoácido y es un conector.

13. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 12, en el que D se elige del grupo constituido por





y



y donde k se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

14. Una composición farmacéutica que contiene un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-13 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-14 para utilizar en el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

oOo

1. Un análogo de GLP-1 que es una secuencia de GLP-1(7-35) (SEQ ID N° 1) modificada que tiene:

i) un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituciones de aminoácidos en comparación con GLP-1(7-35), incluidas

a) un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de GLP-1(7-35), y

b) un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de GLP-1(7-35),

o uno de sus derivados.

2. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 1, en el que el aminoácido o los aminoácidos en una posición equivalente a la posición 30, 31, 32, 33, 34 o 35 de GLP-1(7-35) están ausentes, siempre que si el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33 o 34 está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.

3. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que el análogo de GLP-1 contiene i) un grupo ácido carboxílico C-terminal; o iii) un grupo amida C-terminal.

4. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-3, que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pega.

5. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-4, en el que el aminoácido en la posición 35 está ausente, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 28 aminoácidos.

6. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-5, en el que los aminoácidos en la posición 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 27 aminoácidos.

7. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-6, en el que los aminoácidos en la posición 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 26 aminoácidos.

8. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-7, en el que los aminoácidos en la posición 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 25 aminoácidos.

9. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-8, en el que los aminoácidos en la posición 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 24 aminoácidos.

10. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9, en el que los aminoácidos en la posición 30, 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 23 aminoácidos.

11. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene la secuencia de fórmula (I)

Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-
Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀- Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R

Formula (I) (SEQ ID No: 2)

en la que

- Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- 5 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu como alfa,alfa-dimetil-Glu;
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- 10 Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₀ es Leu, Lys o Cys;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₄ es Ala o Asn;
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- 15 Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
- Xaa₃₁ es Trp, Lys, Cys o está ausente;
- Xaa₃₃ es Val, Lys, Cys o está ausente;
- Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente;
- 20 Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
- R es amida o está ausente;
- siempre que si Xaa₃₀, Xaa₃₁, Xaa₃₂, Xaa₃₃ o Xaa₃₄ está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.

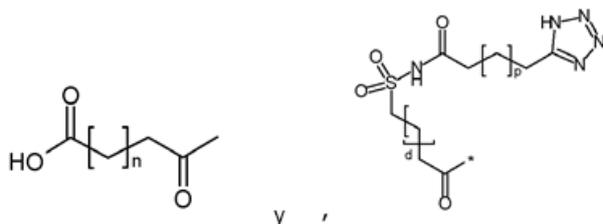
- 25 12. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste que tiene la secuencia de fórmula (II)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-
Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R

en la que

- 30 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- 35 Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
- Xaa₃₃ es Val, Lys o está ausente;
- Xaa₃₄ es Lys, Glu, Arg o está ausente;
- Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
- 40 R es amida o está ausente;

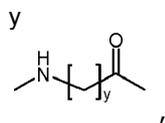
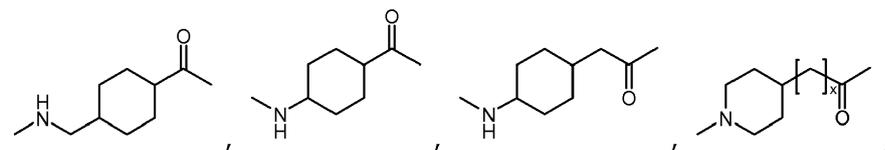
13. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-12, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D- en el que A- se elige del grupo constituido por:



45

en el que n se elige del grupo constituido por 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se elige del grupo constituido por 10, 11, 12, 13 y 14, y d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5,

-B- se elige del grupo constituido por

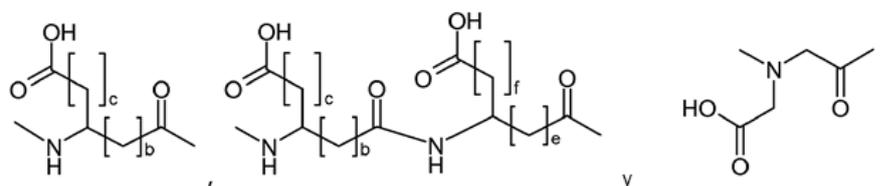


5

donde x se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, e y se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,

-C- se elige del grupo constituido por

10

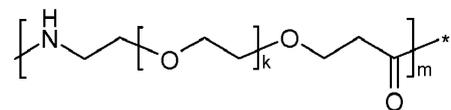


donde b y e se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2, y c y f se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2 con la condición de que b sea 1 o 2 cuando c es 0, o que b sea 0 cuando c es 1 o 2, y e sea 1 o 2 cuando f es 0, o e sea 0 cuando f es 1 o 2, y

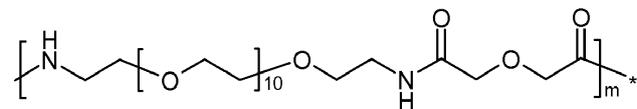
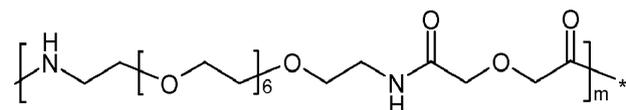
15

- D- está unido al residuo de dicho aminoácido y es un conector.

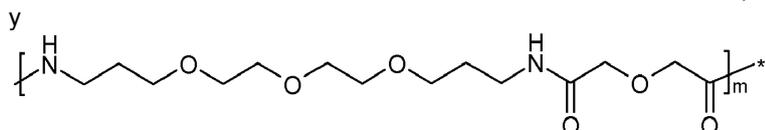
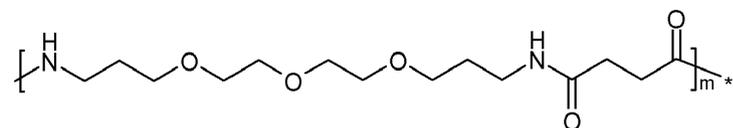
14. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 13, en el que D se elige del grupo constituido por



20



25



30

y donde k se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

15. Un análogo o derivado de GLP-1 que se elige entre los siguientes:



- 5 N epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Glu30,Lys33)GLP-1(7-33)amida;
- 10 N epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30)GLP-1(7-33)amida; [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-33)amida; [Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Glu30]GLP-1 (7-33)amida;
- 15 N epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-[4-Carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Lys20,Glu22,Arg26) GLP-1(7-33)amida; [Glu22,Arg26]GLP-1(7-33) péptido; [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-32)amida;
- 20 N-epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Lys20,Glu22,Arg26) GLP-1(7-33)amida; N-epsilon31 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31)GLP-1(7-33)amida;
- 25 N-epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (DesaminoHis7,Lys20,Glu22,Arg26)GLP-1(7-33)amida; N-epsilon31 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Lys31)GLP-1(7-33)amida;
- 30 N-epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Glu30,Lys31)GLP-1(7-32)amida; N-epsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Nle30,Lys31)GLP-1(7-32)amida; N-epsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31)GLP-1-(7-33)amida; [Desamino His7,Glu22,Arg26]-GLP-1 (7-34); [Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Lys31]GLP-1(7-32)amida;
- 35 N-epsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- (DesaminoHis7,Asp11,Glu18,Glu22,Val25,Arg26,Asp27,Glu30,Lys31)GLP-1(7-33)amida; [Aib8,Glu22,Val25,Lys31]GLP-1(7-33)-amida; y
- 40 N -epsilon31- {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil- N-beta34-(2-(bis-carboximetilamino)acetil)[Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Dap34]GLP-1(7-34)amida.

16. Una composición farmacéutica que contiene un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-15 o una sal, amida, alquilo o éster farmacéuticamente aceptable de éste, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

17. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-15 o una composición farmacéutica según la realización 16, para usar como un medicamento.

18. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-15 o una composición farmacéutica según la realización 16, para utilizar en el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

19. El uso de un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-15 o una composición farmacéutica según la realización 16, en la fabricación de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

20. Un método de tratamiento o prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio,

coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas mediante administración de una cantidad farmacéuticamente activa de un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-15 o una composición farmacéutica según la realización 16.

5 Realizaciones

10 1. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste que comprende una secuencia de GLP-1 7-35 (SEQ ID N° 1) modificada que tiene:

15 un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, incluidas
 un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 1, y
 un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 1,
 opcionalmente el aminoácido o los aminoácidos en una posición equivalente a la posición 30, 31, 32, 33, 34 o
 20 35 de SEQ ID N° 1 pueden estar ausentes siempre que si el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33 o 34 está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente, y
 opcionalmente un grupo amida C-terminal.

2. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 1, que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila.

25 3. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que el aminoácido en la posición 35 está ausente, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 28 aminoácidos.

4. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 27 aminoácidos.

30 5. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 26 aminoácidos.

35 6. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 25 aminoácidos.

7. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 24 aminoácidos.

40 8. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-2, en el que los aminoácidos en la posición 30, 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 23 aminoácidos.

45 9. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-8 que tiene un grupo amida C-terminal.

50 10. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene 3 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26.

55 11. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-10, que tiene una sustitución en una posición elegida del grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.

12. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 11, que tiene una sustitución elegida del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34.

60 13. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 11-12, que tiene una sustitución elegida del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.

14. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 11-13, que tiene una sustitución elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8.

- 5 15. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene 4 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26.
16. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 y 15, que tiene dos sustituciones en posiciones elegidas del grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.
- 10 17. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 15-16, que tiene dos sustituciones elegidas del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34.
- 15 18. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 15-17 que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.
- 20 19. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 15-18 que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.
- 25 20. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene 5 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26.
- 30 21. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 y 20, que tiene tres sustituciones de aminoácidos en posiciones elegidas del grupo de posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.
- 35 22. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 20-21, que tiene tres sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34.
- 40 23. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 20-22 que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y dos sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.
- 45 24. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 20-23 que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y dos sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.
- 50 25. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 que tiene 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1 que incluyen las sustituciones en la posición 22 y 26.
- 55 26. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-9 y 25, que tiene cuatro sustituciones de aminoácidos en posiciones elegidas del grupo de las posiciones 7, 8, 18, 20, 23, 24, 25, 27, 30, 31, 33 y 34.
- 60 27. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 25-26, que tiene cuatro sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por desaminoHis7, Aib8, Lys18, Cys18, Lys20, Cys20, Lys23, Cys23, Asn24, Val25, Ala27, Leu27, Glu30, Lys31, Cys31, Lys33, Cys33, Lys34, Cys34 y Asn34.
28. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 25-27 que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y tres sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.
29. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 25-28 que tiene una sustitución de aminoácido elegida del grupo constituido por desaminoHis7 y Aib8 y tres sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Lys18, Lys20, Lys23, Glu30, Lys31, Lys33 y Lys34.
30. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-29 que tiene la secuencia de fórmula (I)

Xaa₇-Xaa₈-Xaa₉-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa₁₆-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Xaa₂₀-Glu-Glu-Xaa₂₃-
Xaa₂₄-Xaa₂₅-Arg-Xaa₂₇-Phe-Ile-Xaa₃₀- Xaa₃₁-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R

Formula (I) (SEQ ID No: 2)

en la que

- Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- 5 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu como alfa,alfa-dimetil-Glu;
- Xaa₁₆ es Val o Leu;
- 10 Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₀ es Leu, Lys o Cys;
- Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
- Xaa₂₄ es Ala o Asn;
- Xaa₂₅ es Ala o Val;
- 15 Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
- Xaa₃₁ es Trp, Lys, Cys o está ausente;
- Xaa₃₃ es Val, Lys, Cys o está ausente;
- Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente;
- 20 Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
- R es amida o está ausente;
- siempre que si Xaa₃₀, Xaa₃₁, Xaa₃₂, Xaa₃₃ o Xaa₃₄ está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente.
- 25 31. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-29 que tiene la secuencia de fórmula (II)

Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-
Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅- R

Formula (II) (SEQ ID No: 3)

30 en la que

- Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
- Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o
- 35 ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
- Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
- Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
- Xaa₃₃ es Val, Lys o está ausente;
- Xaa₃₄ es Lys, Glu, Arg o está ausente;
- 40 Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
- R es amida o está ausente;
32. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30-31, en el que R está ausente.
- 45 33. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30-32, en el que Xaa₃₅ y R están ausentes.
34. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30-33, en el que Xaa₃₄, Xaa₃₅ y R están ausentes.
- 50 35. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30-34, en el que Xaa₃₃, Xaa₃₄, Xaa₃₅ y R están ausentes.
36. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30 y 32-35 que tiene un total de 2

sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, que son un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 3, un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 3 y 3 sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Xaa₇, Xaa₈, Xaa₁₈, Xaa₃₀, Xaa₃₃, Xaa₃₄ y Xaa₃₅ en SEQ ID N° 3 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.

5 47. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 31-35 que tiene un total de 6 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, que son un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 3, un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 3 y 4 sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Xaa₇, Xaa₈, Xaa₁₈, Xaa₃₀, Xaa₃₃, Xaa₃₄ y Xaa₃₅ en SEQ ID N° 3 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.

15 48. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 31-35 que tiene un total de 7 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, que son un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 3, un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 3 y 5 sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Xaa₇, Xaa₈, Xaa₁₈, Xaa₃₀, Xaa₃₃, Xaa₃₄ y Xaa₃₅ en SEQ ID N° 3 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.

20 49. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 31-35 que tiene un total de 8 sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1, que son un residuo de Glu en una posición equivalente a la posición 22 de SEQ ID N° 3, un residuo de Arg en una posición equivalente a la posición 26 de SEQ ID N° 3 y 3 sustituciones de aminoácidos elegidas del grupo constituido por Xaa₇, Xaa₈, Xaa₁₈, Xaa₃₀, Xaa₃₃, Xaa₃₄ y Xaa₃₅ en SEQ ID N° 3 en comparación con la secuencia 7-35 de SEQ ID N° 1.

25 50. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30-49, en el que Xaa₇ es desamino-histidina.

51. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 30-49, en el que Xaa₈ es Aib.

30 52. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-51, en el que el aminoácido que se pegila o derivatiza con un residuo de unión a la albúmina es un residuo de Lys o un residuo de Cys.

53. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-51, en el que el aminoácido que se pegila o derivatiza con un residuo de unión a la albúmina es un residuo de Lys.

35 54. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-51, en el que el aminoácido C-terminal se pegila o derivatiza con un residuo de unión a la albúmina.

40 55. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-54, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 18, 20, 23, 31, 33, 34 o en el aminoácido C-terminal.

56. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 18.

45 57. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 20.

58. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 23.

50 59. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 31.

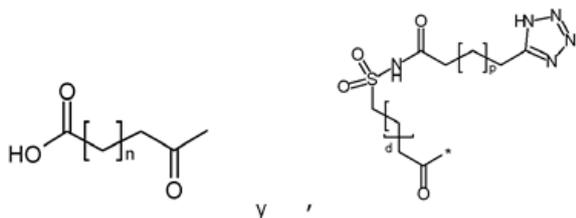
55 60. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 33.

61. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido pegilado o derivatizado con un residuo de unión a la albúmina en la posición 34.

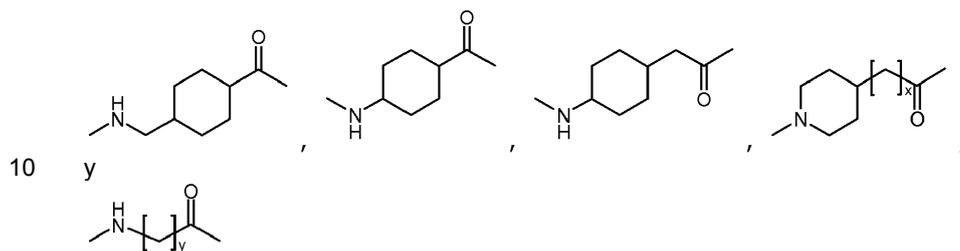
60 62. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-55, que ha sido derivatizado con un residuo de unión a la albúmina.

63. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-62, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-

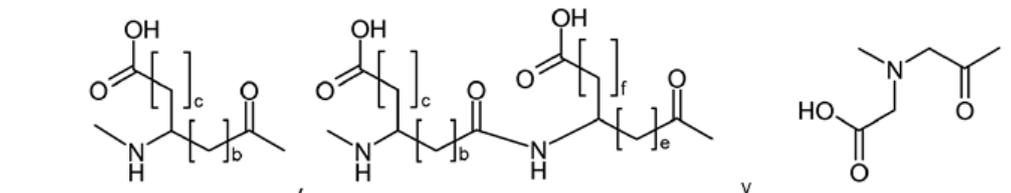
en el que A- se elige del grupo constituido por:



- 5 donde n se elige del grupo constituido por 14, 15, 16 17, 18 y 19, p se elige del grupo constituido por 10, 11, 12, 13 y 14, y d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5,
 -B- se elige del grupo constituido por



- 10 y
 donde x se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, e y se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,
 -C- se elige del grupo constituido por



- 15
 donde b y e se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2, y c y f se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2 con la condición de que b sea 1 o 2 cuando c es 0, o que b sea 0 cuando c es 1 o 2, y e sea 1 o 2 cuando f es 0, o e sea 0 cuando f es 1 o 2, y
 - D- está unido al residuo de dicho aminoácido y es un conector.

20 64. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 61, en el que un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D-.

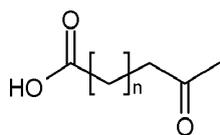
25 65. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-64, en el que el residuo de aminoácido derivatizado contiene un grupo amino.

30 66. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-65, en el que el residuo de aminoácido derivatizado contiene un grupo amino primario en una cadena lateral.

35 67. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-66, en el que el residuo de aminoácido derivatizado es un residuo de lisina.

68. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-67, en el que sólo un residuo de aminoácido se derivatiza.

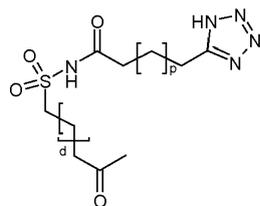
69. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-68, en el que A- es



70. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-69, en el que n se elige del grupo constituido por 15 y 17, y más preferentemente es 17.

5

71. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-68, en el que A- es



72. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-68 y 69, en el que p se elige del grupo constituido por 12, 13 y 14, y preferentemente es 13.

10

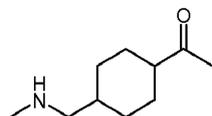
73. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 61-68 y 69-70, en el que d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, más preferentemente 0, 1 y 2, y muy preferentemente es 1.

15

74. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-68 y 69-71, en el que d se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2, y p se elige del grupo constituido por 12, 13 o 14, más preferentemente d se elige del grupo constituido por 1 y 2, y p se elige del grupo constituido por 13 y 14, y muy preferentemente d es 1 y p es 13.

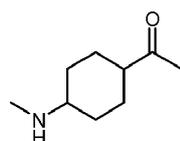
20

75. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-74, en el que -B- es



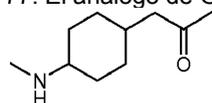
76. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-74, en el que -B- es

25



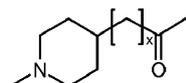
77. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-74, en el que -B- es

30



78. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-74, en el que -B- es

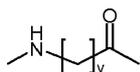
35



79. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 78, en el que x se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2, más preferentemente x se elige del grupo constituido por 0 y 1, y muy preferentemente x es 1.

40

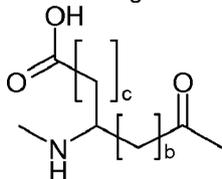
80. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-74, en el que -B- es



5

81. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 80, en el que y se elige del grupo constituido por 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10, y más preferentemente y se elige del grupo constituido por 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8.

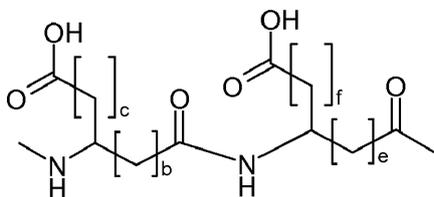
82. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-81, en el que -C- es



10

83. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 82, en el que c se elige del grupo constituido por 0 y 1, y b se elige del grupo constituido por 1 y 2, más preferentemente b es 1 y c es 0.

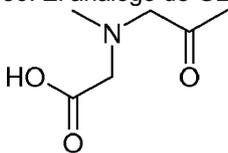
84. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-81, en el que -C- es



15

85. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 84, en el que f se elige del grupo constituido por 0 y 1, y e se elige del grupo constituido por 1 y 2, más preferentemente e es 1 y f es 0.

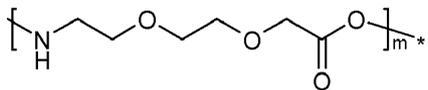
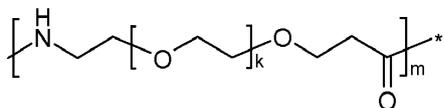
86. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-81, en el que -C- es



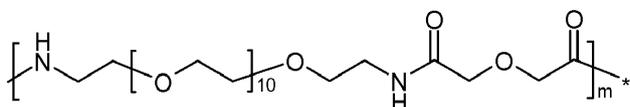
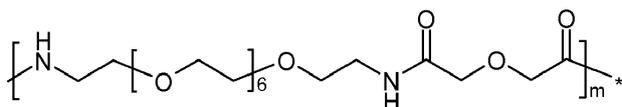
20

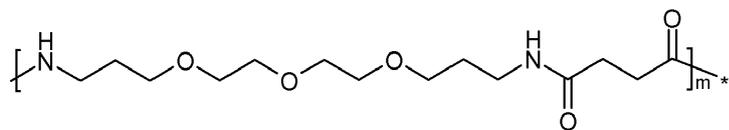
87. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-86, en el que D se elige del grupo constituido por

25

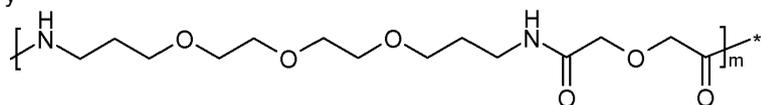


30



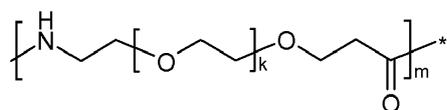


y



5 y donde k se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

88. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-87, en el que -D- es



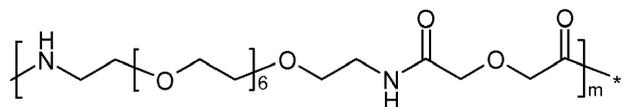
10

89. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 88, en el que k se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 11 y 27 y más preferentemente k es 1.

15 90. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 88-89, en el que m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

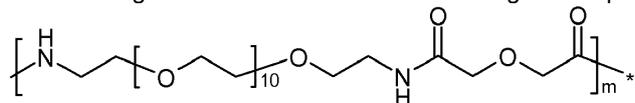
20 91. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 91, en el que m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

92. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 63-87, en el que -D- es



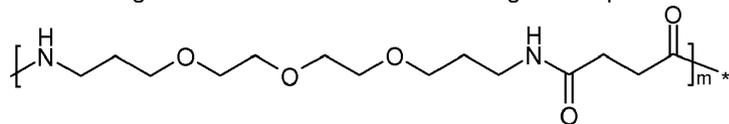
25 93. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 93, en el que m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

94. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-87, en el que -D- es



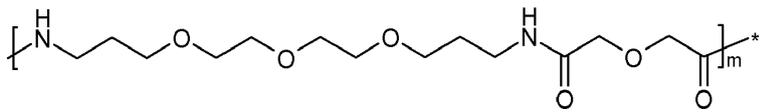
30 95. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 95, en el que m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

96. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-87, en el que -D- es



35 97. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 97, en el que m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

40 98. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-87, en el que -D- es

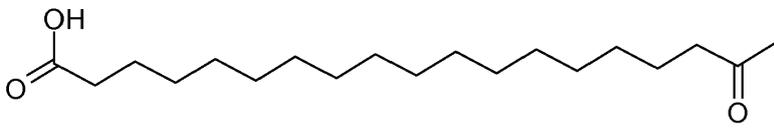
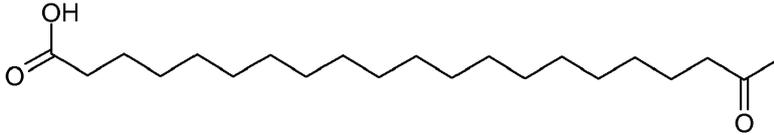


5

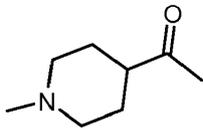
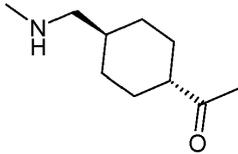
99. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según la realización 99, en el que m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, y más preferentemente m se elige del grupo constituido por 0, 1 y 2.

100. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-100, en el que A-B-C-D- se elige y se combina entre

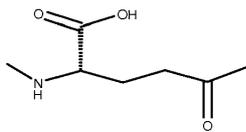
A-

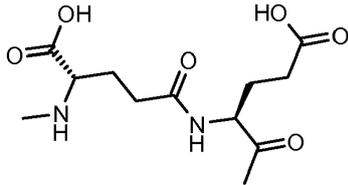
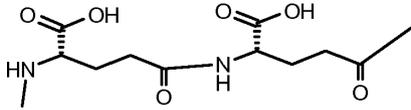
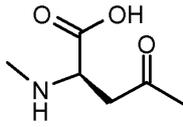


-B-

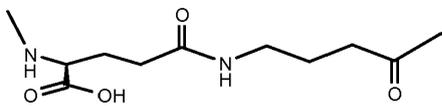
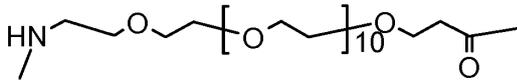
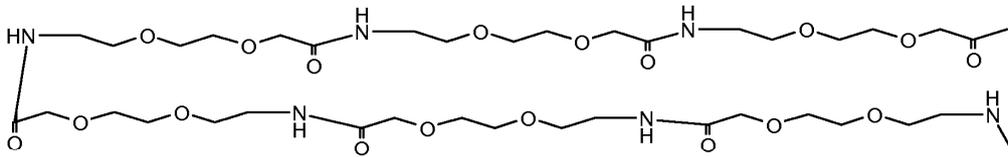
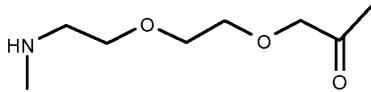
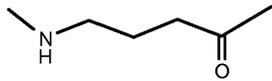
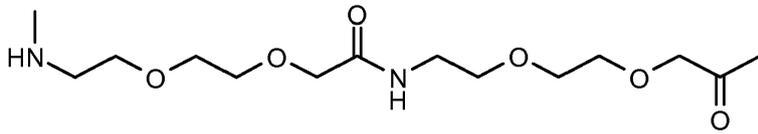


-C-



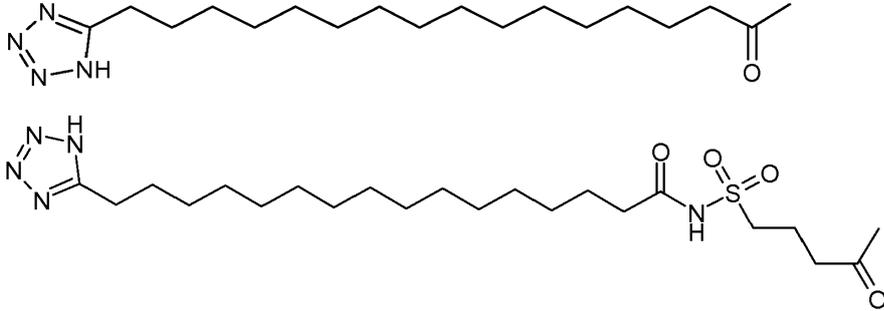


-D-

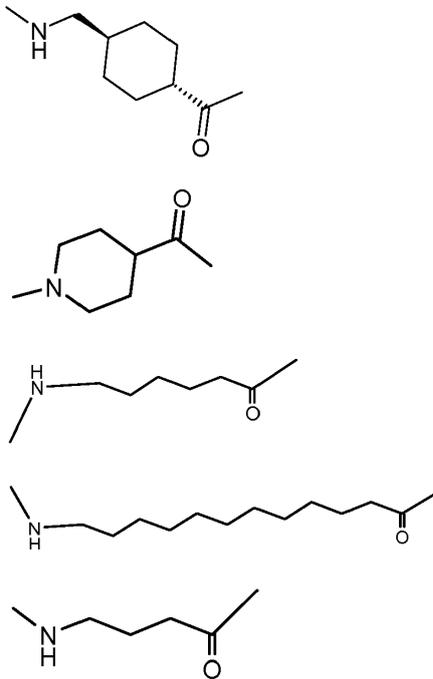


101. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-100, en el que A-B-C-D- se elige y se combina entre

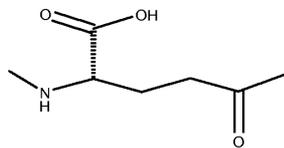
A-

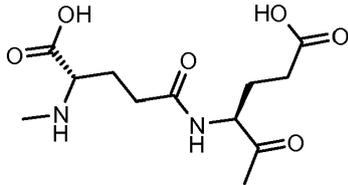
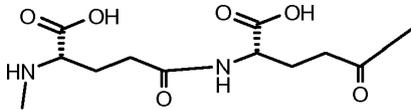
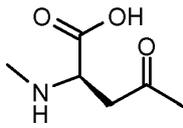


-B-

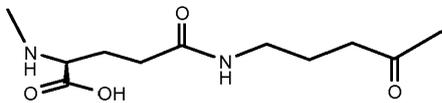
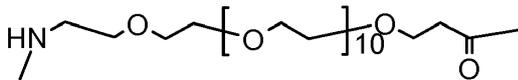
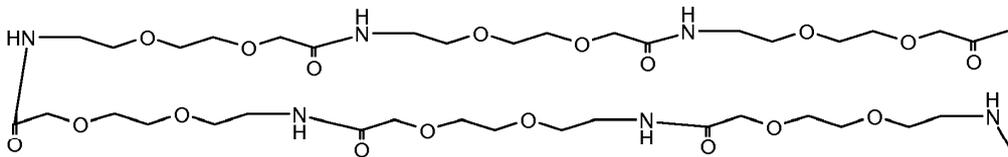
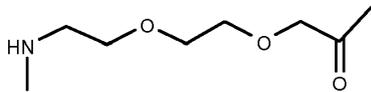
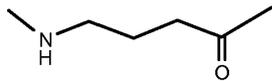
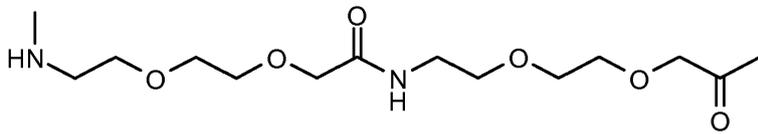


-C-

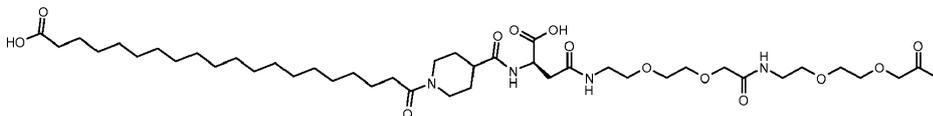
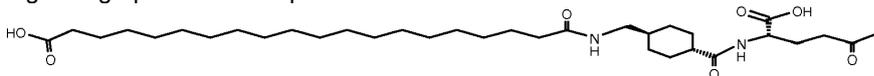


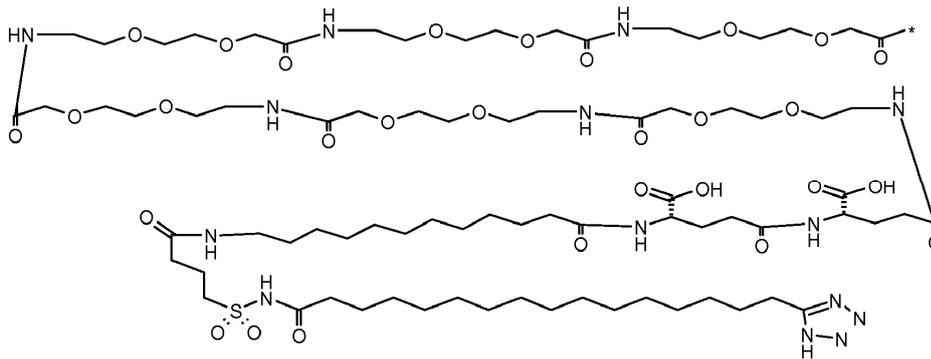
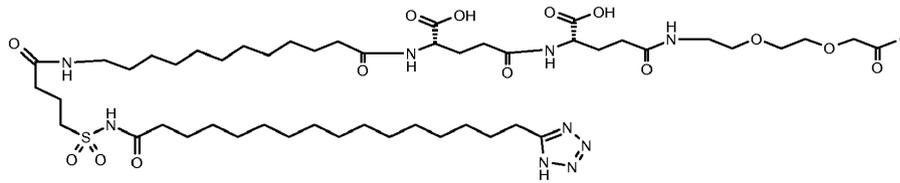
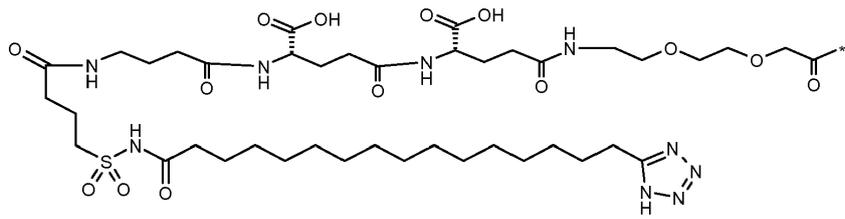
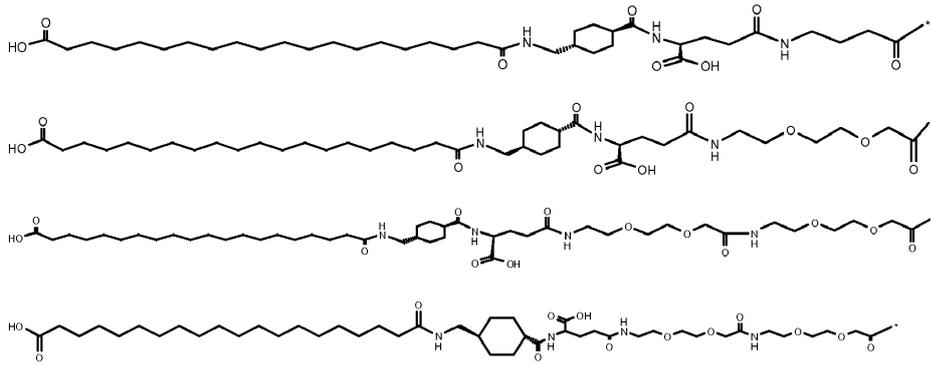


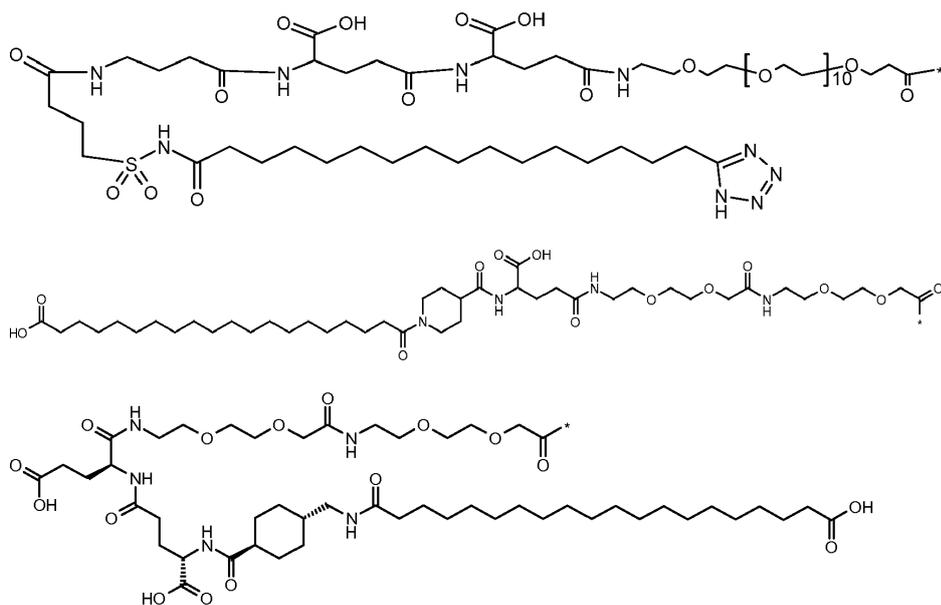
-D-



5 102. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-100, en el que A-B-C-D- se elige del grupo constituido por







5

103. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-103, que comprende un conector hidrófilo entre la secuencia de GLP-1 modificada y uno o más residuos de unión a la albúmina.

104. El análogo de GLP-1 o el derivado de éste según la realización 104, en el que el conector hidrófilo es una porción oligo etilenglicol no ramificada con grupos funcionales adecuados en ambos extremos que forma un puente entre un grupo amino de la secuencia de GLP-1 modificada y un grupo funcional del residuo de unión a la albúmina.

105. El análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones anteriores, que se elige del grupo constituido por

- | | |
|----|--|
| 15 | [Glu22,Arg26]GLP-1 (7-33) amida,
N épsilon20 {2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi- |
| | heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]- |
| 20 | (Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Glu30, Lys33)GLP-1(7-33)amida,
N épsilon20 {2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi- |
| | heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]- (Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30) GLP-1(7-33)amida, |
| | [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-33)amida, |
| 25 | N épsilon20 {2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi- |
| | heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]- (Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30) GLP-1(7-33)amida, |
| | [Glu22, Arg26]GLP-1(7-33)péptido, |
| 30 | N épsilon20 {2-(2-[2-[2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxi- |
| | heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-[Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Glu30] |
| | GLP-1 (7-33)amida, y [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-32)amida. |

106. Un método para aumentar el tiempo de acción en un paciente de un análogo de GLP-1 o derivado de éste, caracterizado porque una secuencia de GLP-1 7-35 (SEQ ID No 1) modificada se derivatiza o pega según se da a conocer en cualquiera de las realizaciones precedentes.

107. Un método para aumentar el tiempo de acción en un paciente de un análogo de GLP-1 o derivado de éste a más de 40 horas, caracterizado porque una secuencia de GLP-1 7-37 (SEQ ID No 1) modificada se derivatiza o pega según se da a conocer en cualquiera de las realizaciones precedentes.

108. Una composición farmacéutica que contiene un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-107 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

109. La composición farmacéutica de acuerdo con la realización 109, que es adecuada para la administración parenteral.

110. El uso de un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-107 para la preparación de un medicamento.

111. El uso de un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-107 para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

112. El uso de un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-107 para la preparación de un medicamento destinado a retrasar o prevenir el avance de la enfermedad en la diabetes tipo 2.

113. El uso de un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-107 para la preparación de un medicamento destinado a disminuir el consumo de alimentos, disminuir la apoptosis de las células β , aumentar la función de las células β y la masa de las células β , y/o restaurar la sensibilidad a la glucosa de las células β .

114. Un análogo de GLP-1 o derivado de éste según cualquiera de las realizaciones 1-107 para utilizar en el tratamiento o la prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.

Todos los títulos y subtítulos se usan en este documento sólo a efectos de conveniencia y no deben ser tomados como limitantes de la invención en modo alguno.

Cualquier combinación de los elementos descritos antes en todas sus variaciones posibles está comprendida por la invención, a menos que se indique lo contrario en este documento o el contexto lo contradiga claramente.

Los términos "un" y "una" y "el" y "la" y referentes similares utilizados en el contexto de describir la invención se debe considerar que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o el contexto lo contradiga claramente.

La relación de intervalos de valores en este documento pretende simplemente servir como un método de escritura rápido para referirse individualmente a cada valor diferente comprendido en un intervalo, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor diferente es incorporado en la memoria como si se hubiera indicado individualmente en el documento. A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos provistos son representativos de los valores aproximados correspondientes (por ej., todo los ejemplos de valores exactos provistos con respecto a un factor o una medida particular se puede considerar que también proporcionan una medida aproximada correspondiente, modificada por "aproximadamente", cuando corresponda).

Todos los métodos descritos en este documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente.

El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o el lenguaje ejemplificante (por ej., "como") provistos aquí, pretende únicamente iluminar mejor la invención y no plantea ninguna limitación al alcance de la misma a menos que se indique lo contrario. Ningún lenguaje de esta memoria se debe interpretar que indica que algún elemento es esencial para la práctica de la invención a menos que se establezca explícitamente.

Citar e incorporar documentos de patente en esta memoria se hace sólo por conveniencia y no refleja ninguna visión de la validez, patentabilidad y/o aplicabilidad de dichos documentos de patente.

La descripción de cualquier aspecto o realización de la invención empleando términos como "comprende/que comprende", "tiene/que tiene", "que incluye/incluido(a)(s)" o "contiene/que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar respaldo para un aspecto o realización similar de la invención que "esté constituido(a) por", "esté constituido(a) esencialmente por", o "consista sustancialmente en" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente (por ej., una formulación que se describa aquí que contiene un elemento particular se debe entender que también describe una formulación que está constituida por ese elemento, a menos que se indique lo contrario o el contexto lo contradiga claramente).

Esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la temática mencionada en los aspectos o las reivindicaciones presentados en este documento en la medida máxima en que lo permita la ley aplicable.

La presente invención se ilustra aún más en los métodos y ejemplos representativos siguientes los cuales, no obstante, no pretenden limitar el alcance de la invención en modo alguno.

Las características dadas a conocer en la descripción precedente y en los ejemplos siguientes pueden, tanto separadamente como en cualquier combinación de ellas, ser material para realizar la invención en sus diversas formas.

5

Ejemplos

Abreviaturas utilizadas:

10

t.a.:	temperatura ambiente
DIPEA:	diisopropiletilamina
H ₂ O:	agua
CH ₃ CN:	acetonitrilo
DMF:	N,N-dimetilformamida
HBTU:	hexafluorofosfato de de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio
Fmoc:	9 H-fluoren-9-ilmtoxycarbonilo
Boc:	tert-butiloxycarbonilo
OtBu:	éster tert-butílico
tBu:	tert-butilo
Trt:	trifenilmetilo
Pmc:	2,2,5,7,8-pentametil-croman-6-sulfonilo
Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)etilo
ivDde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutilo
Mtt:	4-metiltrilito
Mmt:	4-metoxitritilo
DCM:	diclorometano
TIS:	triisopropilsilano
TFA:	ácido trifluoroacético
Et ₂ O:	éter dietílico
NMP:	1-metil-pirrolidin-2-ona
DIPEA:	diisopropiletilamina
HOAt:	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
DIC:	diisopropilcarbodiimida
DBU:	1,8-diazabicyclo-[5,4,0]undeceno-7
PM:	peso molecular

A: Síntesis de péptido unido a resina

SPPS Método A.

15

20

La peptidil-resina protegida se sintetizó según la estrategia de Fmoc en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 433 en una escala de 0.25 mmol o 1.0 mmol utilizando los protocolos FastMoc UV provistos por el fabricante que emplean acoplamientos mediados por HBTU (hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) o HATU (hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio) en NMP (N-metilpirrolidona) y monitoreo UV de la eliminación del grupo protector Fmoc. La resina de partida utilizada para la síntesis de las péptido amidas fue la resina Rink-Amida, y la resina Wang o clorotritilo se usó para los péptidos con

un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos utilizados fueron aminoácidos-Fmoc estándar (suministrados por ejemplo por Anaspec o Novabiochem) provistos en cartuchos pesados previamente adecuados para el sintetizador ABI433A con excepción de los aminoácidos no naturales como Fmoc-Aib-OH (Fmoc-ácido aminoisobutírico). El aminoácido N-terminal se protegió con Boc en el grupo alfa amino (por ej. se usó Boc-His(Boc)OH para los péptidos con His en el extremo N-terminal). El grupo épsilon amino de la lisina en posición 26 se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, dependiendo de la ruta para la unión de la porción de unión a la albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos puede en algunos casos ser mejorada por el uso de dipéptidos protegidos en el enlace amida del dipéptido con un grupo que puede ser escindido en condiciones ácidas por ejemplo, pero no exclusivamente, a 2-Fmoc-oxi-4-metoxibencilo o 2,4,6-trimetoxibencilo. En los casos en que está presente una serina o una treonina en el péptido, se pueden usar dipéptidos de pseudoprolina (véase, por ej. el catálogo de Novabiochem 2002/2003 o una versión más nueva, o W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403.

SPPS Método B:

Un método alternativo (método B) de síntesis de péptidos fue la química de Fmoc en un sintetizador de péptidos Liberty a base de microondas (CEM Corp., Carolina del norte). La resina fue Tentagel S RAM con una carga de 0.24 mmol/g. La química de acoplamiento fue DIC/HOAt en NMP utilizando soluciones de aminoácido 0.3 M en NMP y un exceso molar de 8-10 veces. Las condiciones de acoplamiento fueron 5 minutos hasta 70 °C. La desprotección se hizo con 5% de piperidina en NMP hasta 70 °C. Cuando se deseaba una modificación química de una cadena lateral de la lisina, la lisina se incorporaba como Lys(Mtt). El grupo Mtt se eliminó suspendiendo la resina en hexafluoroisopropanol puro durante 20 minutos seguido de lavado con DCM y NMP. La modificación química de la lisina se realizó por síntesis manual o mediante uno o más pasos automatizados en el sintetizador Liberty seguido de acoplamiento manual. Otro método de síntesis de péptidos fue mediante química de Fmoc en un ABI 433 con acoplamiento por HBTU. Luego de la síntesis la resina se lavó con DCM y se secó, y el péptido se escindió de la resina mediante un tratamiento de 2 horas con TFA/TIS/agua (92.5/5/2.5) seguido de precipitación con éter dietílico. El péptido se redisolvió en ácido acético al 30% o un solvente similar y se purificó por RP-HPLC estándar en una columna C18 utilizando acetonitrilo/TFA. La identidad del péptido se confirmó por MALDI-MS.

SPPS Método C

La peptidil-resina protegida se sintetizó según la estrategia de Fmoc en un sintetizador Advanced ChemTech (APEX 348) en una escala de 0.25 mmol empleando los protocolos provistos por el fabricante que emplean acoplamientos mediados por DIC (diciclohexilcarbodiimida) y HOBt (1-hidroxibenzotriazol) en NMP (N-metilpirrolidona). La resina de partida utilizada para la síntesis de las péptido amidas fue la resina Rink-Amida, y la resina Wang o clorotritilo se usó para los péptidos con un carboxi C-terminal. Los derivados de aminoácidos protegidos utilizados fueron los Fmoc-aminoácidos estándar (suministrados por ejemplo por Anaspec o Novabiochem). El aminoácido N-terminal se protegió con Boc en el grupo alfa amino (por ej. se usó Boc-His(Boc)OH para los péptidos con His en el extremo N-terminal). El grupo épsilon amino de la lisina en posición 26 se protegió con Mtt, Mmt, Dde, ivDde o Boc, dependiendo de la ruta para la unión de la porción de unión a la albúmina y el espaciador. La síntesis de los péptidos pueden algunos casos ser mejorada por el uso de dipéptidos por ej. pseudoprolinas de Novabiochem, Fmoc-Ser(tbu)-ΨSer(Me,Me)-OH, véase por ej., el catálogo de Novabiochem 2002/2003 o una versión más nueva o W.R. Sampson (1999), J. Pep. Sci. 5, 403

Procedimiento para la eliminación de la protección con ivDde o Dde

Se colocó la resina (0.25 mmol) en un aparato de agitación/filtración manual y se trató con hidrazina al 2% en N-metilpirrolidona (20 ml, 2 x 12 min) para eliminar el grupo Dde o ivDde y se lavó con N-metilpirrolidona (4 x 20 ml).

Procedimiento para la eliminación de la protección con Mtt o Mmt

Se colocó la resina (0.25 mmol) en un aparato de agitación/filtración manual y se trató con TFA al 2% y TIS 2-3% en DCM (20 ml, 5-10 min se repitió 6-12 veces) para eliminar el grupo Mtt o Mmt y se lavó con DCM (2 x 20 ml), MeOH al 10% y DIPEA al 5% en DCM (2 x 20ml) y N-metilpirrolidona (4 x 20 ml).

Procedimiento alternativo para la eliminación de la protección con Mtt:

Se colocó la resina en una jeringa y se trató con hexafluoroisopropanol durante 2 X 10 min para eliminar el grupo Mtt. Después la resina se lavó con DCM y NMP como se describió antes.

Procedimiento para la unión de cadenas laterales al residuo de lisina.

El residuo de unión a la albúmina (B-U-cadena lateral de fórmula I) se puede unir al péptido mediante acilación al péptido unido a la resina o acilación en solución al péptido sin proteger usando reactivos de acilación estándar como, pero no exclusivamente, DIC, HOBt/DIC, HOAt/DIC o HBTU.

Unión al péptido unido la resina:

Ruta I

5 El residuo de unión a la albúmina (A-B)-cadena lateral de fórmula I) activado (éster activo o anhídrido simétrico) como el éster mono-(2,5-pirrolidinio-1-il) del ácido octadecanodioico (Ebashi *et al.* EP511600, 4 equivalentes molares con relación al péptido unido a la resina) se disolvió en NMP (25 mL), se agregó a la resina y se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se filtró y la resina se lavó exhaustivamente con NMP, diclorometano, 2-propanol, metanol y éter dietílico.

Ruta II

10 El residuo de unión a la albúmina (A-(B)- cadena lateral de fórmula I) se disolvió en N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1, 10 ml). Se agregaron el reactivo de activación como hidroxibenzotriazol (HOBt) (4 equivalentes molares en relación con la resina) y diisopropilcarbodiimida (4 equivalentes molares en relación con la resina) y la solución se agitó durante 15 min. La solución se agregó a la resina y se agregó diisopropiletilamina (4 equivalentes molares en relación con la resina). La resina se agitó 2 a 24 horas a temperatura ambiente. La resina se lavó con N-metilpirrolidona (2 x 20 ml), N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 ml) y cloruro de metileno (2 x 20 ml).

Ruta III

20 El residuo de unión a la albúmina (A-B-cadena lateral de fórmula I) activado (éster activo o anhídrido simétrico) como el éster mono-(2,5-pirrolidinio-1-il) del ácido octadecanodioico (Ebashi *et al.* EP511600, 1-1.5 equivalentes molares con relación al péptido) se disolvió en un solvente orgánico como acetonitrilo, THF, DMF, DMSO o en una mezcla de agua/solvente orgánico (1-2 ml) y se agregó a una solución del péptido en agua (10-20 ml) junto con 10 equivalentes molares de DIPEA. En el caso de grupos protectores en el residuo de unión a la albúmina como *tert*-butilo, la mezcla de reacción se liofilizó toda la noche y después se desprotegió el péptido crudo aislado - en el caso de un grupo *tert*-butilo el péptido se disolvió en una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (90:5:5). Después de 30 minutos la mezcla se evaporó al vacío y el péptido final se purificó por HPLC preparativa.

30 Procedimiento para la eliminación de la protección con Fmoc: Se colocó la resina (0.25 mmol) en un matraz de vidrio en un aparato de agitación manual y se trató con N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 ml) y con N-metilpirrolidona (1 x 20 ml), una solución de piperidina al 20% en N-metilpirrolidona (3 x 20 ml, 10 min cada uno). La resina se lavó con N-metilpirrolidona (2 x 20 ml), N-metilpirrolidona/cloruro de metileno (1:1) (2 x 20 ml) y cloruro de metileno (2 x 20 ml).

35 Procedimiento para escindir el péptido de la resina: El péptido se escindió de la resina agitando durante 180 min a temperatura ambiente con una mezcla de ácido trifluoroacético, agua y triisopropilsilano (95:2.5:2.5 a 92:4:4). La mezcla de escisión se filtró y el filtrado se concentró hasta obtener un aceite mediante una corriente de nitrógeno. El péptido crudo se precipitó de este aceite con 45 ml de éter dietílico y se lavó 1 a 3 veces con 45 ml de éter dietílico.

40 Purificación: El péptido crudo se purificó por HPLC semipreparativa en una columna de 20 mm x 250 mm empacada con sílice C-18 de 5 μ o 7 μ . Dependiendo del péptido se usaron uno o dos sistemas de purificación.

45 TFA: Después de secarlo, el péptido crudo se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50% en H₂O, se diluyó a 20 ml con H₂O y se inyectó en una columna que después se eluyó con un gradiente de 40-60% de CH₃CN en 0.1% de TFA, 10 ml/min durante 50 min a 40 °C. Se recogieron las fracciones que contenían el péptido. El péptido purificado se liofilizó después de la dilución del eluido con agua.

50 Sulfato de amonio: La columna se equilibró con 40% de CH₃CN en (NH₄)₂SO₄ 0.05 M, que se ajustó a pH 2.5 con H₂SO₄ concentrado. Después de secarlo el péptido crudo se disolvió en 5 ml de ácido acético al 50% en H₂O, se diluyó a 20 ml con H₂O y se inyectó en la columna que después se eluyó con un gradiente de 40% - 60% de CH₃CN en (NH₄)₂SO₄ 0.05 M, pH 2.5 a 10 ml/min durante 50 min a 40 °C. Se recogieron las fracciones que contenían el péptido, se diluyeron con 3 volúmenes de H₂O y se pasaron a través de un cartucho Sep-Pak[®] C18 (Waters N° de pieza 51910) que se equilibró con 0.1% de TFA. Después se eluyó con 70% de CH₃CN que contenía 0.1% de TFA y el péptido purificado se aisló por liofilización después de la dilución del eluido con agua.

El producto final obtenido se caracterizó por RP-HPLC analítica (tiempo de retención) y por LCMS.

60 El análisis de RP-HPLC se puede realizar utilizando detección UV a 214 nm y por ejemplo una columna Vydac 218TP54 de 4.6 mm x 250 mm de sílice C-18 de 5 μ (The Separations Group, Hesperia, EE.UU.) y se eluyó por ejemplo a 1 ml/min a 42 °C. La mayoría de las veces se usaron las condiciones específicas siguientes:

Método 03_A1_1

ES 2 550 363 T3

5 HPLC (Método 03_A1_1): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Se obtuvieron detecciones UV a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna 218TP54 de 4.6 mm x 250 mm de sílice C-18 de 5 μ (The Separations Group, Hesperia), que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con 10% de sulfato amonio 0.5 M, que se ajustó a pH 2.5 con ácido sulfúrico 4 M. Después de la inyección, la muestra se eluyó con un gradiente de 0% a 60% de acetonitrilo en el mismo tampón acuoso durante 50 min.

Método 03_B1_2

10 HPLC (Método 03_B1_2): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Se obtuvieron detecciones UV a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna Zorbax 300SB C-18 (4.5 x 150 mm, 5 μ), que se eluyó a 0.5 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con una solución acuosa de TFA en agua (0.1%). Después de la inyección, la muestra se eluyó con un gradiente de 0% a 60% de acetonitrilo (+ 0.1% de TFA) en una solución acuosa de TFA en agua (0.1%), durante 50 min.

Método 02_B1_1

20 HPLC (Método 02_B1_1): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Alliance Waters 2695 equipado con un detector de banda dual Waters 2487. Se obtuvieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm empleando una columna Ydac 218TP53, C18, 300Å, 5 μ m, 3.2 mm x 250 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 0-60% de acetonitrilo, 95-35% de agua y 5% de ácido trifluoroacético (1.0%) en agua, en 50 minutos, a una velocidad de flujo de 0.50 ml/min.

Método 01_B4_2

25 HPLC (Método 01_B4_2): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Waters 600S equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Se obtuvieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm empleando una columna Symmetry300 C18, 5 μ m, 3.9 mm x 150 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 5-95% de acetonitrilo, 90-0% de agua y 5% de ácido trifluoroacético (1.0%) en agua, en 15 minutos, a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min.

Método 02_B4_4

35 HPLC (Método 02_B4_4): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Alliance Waters 2695 equipado con un detector de banda dual Waters 2487. Se obtuvieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm empleando una columna Symmetry300 C18, 5 μ m, 3.9 mm x 150 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 5-95% de acetonitrilo, 90-0% de agua y 5% de ácido trifluoroacético (1.0%) en agua, en 15 minutos, a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min.

Método 02_B6_1

40 HPLC (Método 02_B6_1): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Alliance Waters 2695 equipado con un detector de banda dual Waters 2487. Se obtuvieron detecciones UV a 214 nm y 254 nm empleando una columna Ydac 218TP53, C18, 300Å, 5 μ m, 3.2 mm x 250 mm, 42 °C. Se eluyó con un gradiente lineal de 0-90% de acetonitrilo, 95-5% de agua y 5% de ácido trifluoroacético (1.0%) en agua, en 50 minutos, a una velocidad de flujo de 0.50 ml/min.

Método 03_B6_1

50 HPLC (Método 03_B1_1): El análisis de RP se realizó empleando un sistema Waters 2690 equipado con un detector de arreglo de diodos Waters 996. Se obtuvieron detecciones UV a 214, 254, 276 y 301 nm en una columna 218TP54 de 4.6 mm x 250 mm de sílice C-18 de 5 μ (The Separations Group, Hesperia), que se eluyó a 1 ml/min a 42 °C. La columna se equilibró con 5% de acetonitrilo (+ 0.1% de TFA) en una solución acuosa de TFA en agua (0.1%). Después de la inyección, la muestra se eluyó con un gradiente de 0% a 90% de acetonitrilo (+ 0.1% de TFA) en una solución acuosa de TFA en agua (0.1%), durante 50 min.

HPLC (Método I_BDSB2):

60 Tampón A: tris 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 15 mM, pH ajustado a 7.3 con H₂SO₄ 4 N, acetonitrilo al 20% v/v
Tampón B: acetonitrilo al 80% v/v
Flujo: 1.0 ml/min
Gradiente: 0-20 min 10-50% de B
Columna: Phenomenex, Jupiter 4.6 mm x 150 mm, C4, 5 μ , 300 Å
Temperatura de la columna: 40 °C.

Alternativamente se puede realizar una elución por gradiente preparativa como se indica antes y el porcentaje de acetonitrilo al cual eluye el compuesto está indicado. La identidad se confirma por MALDI.

5 Se usó el equipamiento siguiente:
LCMS se realizó en un sistema que constaba de un espectrómetro de masas Sciex API 100 Single tipo cuádrupolo, bomba Perkin Elmer Serie 200 Quard, muestreador automático Perkin Elmer Serie 200, detector UV Applied Biosystems 785A, detector evaporativo de dispersión de la luz Sedex 75.

10 El control del instrumento y la adquisición de datos se hicieron mediante el software de control Sciex Sample corriendo en una computadora con Windows 2000.

La bomba de HPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

15 A: ácido trifluoroacético al 0.05% en agua
B: ácido trifluoroacético al 0.05% en acetonitrilo

El análisis se realizó a temperatura ambiente inyectando un volumen adecuado de la muestra (preferentemente 20 µl) en la columna, que se eluyó con un gradiente de acetonitrilo.

20 Las condiciones de HPLC, parámetros del detector y parámetros del espectrómetro de masas utilizados se indican en la tabla siguiente.

25 Columna: Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm
Gradiente: 5% - 90 % de acetonitrilo lineal durante 7.5 min a 1.5 ml/min
Detección: 210 nm (salida análoga del DAD)
ELS (salida análoga del ELS), 40 °C
MS modo de ionización API-ES

30 La LCMS alternativa se realizó en un sistema que constaba de bomba binaria Hewlett Packard serie 1100 G1312A, compartimiento de columna Hewlett Packard serie 1100, detector de arreglo de diodos Hewlett Packard serie 1100 G1315A DAD, Hewlett Packard serie 1100 MSD y detector evaporativo de dispersión de la luz Sedex 75 controlado por el software HP Chemstation. La bomba de HPLC se conectó a dos recipientes de eluyente que contenían:

35 A: NH₄OH 10 mM en agua
B: NH₄OH 10 mM en 90% de acetonitrilo

El análisis se realizó a 23 °C inyectando un volumen adecuado de la muestra (preferentemente 20 µl) en la columna que se eluyó con un gradiente de A y B.

40 Las condiciones de HPLC, parámetros del detector y parámetros del espectrómetro de masas utilizados se indican en la tabla siguiente.

45 Columna Waters Xterra MS C-18 X 3 mm di 5 µm
Gradiente 5% - 100% de acetonitrilo lineal durante 6.5 min a 1.5 ml/min
Detección a 210 nm (salida análoga del DAD)
ELS (salida análoga del ELS)
MS modo de ionización API-ES, intervalo de escaneo 100-1000 amu paso 0.1 amu

MALDI-MS:

50 Los pesos moleculares de los péptidos se determinaron usando espectroscopía de masas de tiempo de vuelo desorción láser asistida por matriz (MALDI-MS), y se registraron en un Microflex (Bruker). Se utilizó una matriz de ácido α-ciano-4-hidroxicinámico.

Condiciones de HPLC analítica (método I):

55 Equilibrado de la columna (Xterra TM MS C18, 5 µm, 4.6 x 150 mm, P7N 186 000490) con 0.1% de TFA/H₂O y elución con gradiente de 0% de CH₃CN/0.1% de TFA/H₂O hasta 60% de CH₃CN/0.1% de TFA/H₂O durante 25 min seguido de un gradiente de 60% a 100% en 5 min.

60 En los ejemplos de esta invención la nomenclatura y las gráficas estructurales significan:
Se usan símbolos de una letra para los aminoácidos naturales, por ej. H es L-histidina, A es L-alanina, etc. También se pueden usar abreviaturas de tres letras para los aminoácidos, por ej. His es L-histidina, Ala es L-alanina, etc. Para los aminoácidos no naturales se usan abreviaturas de tres letras, como Aib para ácido aminoisobutírico. La posición de los aminoácidos puede ser indicada con un número en supraíndice después del símbolo del aminoácido

como Lys³³, o como Lys33. El grupo amino N-terminal se puede simbolizar como NH₂ o como H. El grupo carboxílico C-terminal se puede simbolizar como -OH o como -COOH. El grupo amida C-terminal se simboliza como -NH₂

Las subestructuras

5



significan ambas His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe.

10 El grupo épsilon amino de la Lisina se puede describir también como el símbolo griego ε o deletreado "épsilon".

Las estructuras de los ejemplos siguientes son en varios casos una combinación de símbolos de una letra para los aminoácidos naturales, combinados con las abreviaturas de tres letras Aib para el ácido aminoisobutírico. En varios casos algunos de los aminoácidos se muestran en la estructura completa expandida. Por lo tanto, la lisina que ha sido derivatizada se puede mostrar como las estructuras completas expandidas como en el ejemplo 2 en el que la lisina en la posición 20 está expandida. El nitrógeno (con H indicado) entre la tirosina en posición 19 y la lisina expandida en posición 20 es por lo tanto el nitrógeno del enlace peptídico que conecta los dos aminoácidos en el ejemplo 2. Según el procedimiento anterior, los derivados siguientes se prepararon como ejemplos no limitantes de la invención:

20

Ejemplo 1

[Glu22,Arg26]GLP-1 (7-33) amida
H-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A A R E F I A W V-NH₂

25

Método de preparación: B

El péptido se eluyó a 64% de acetonitrilo.

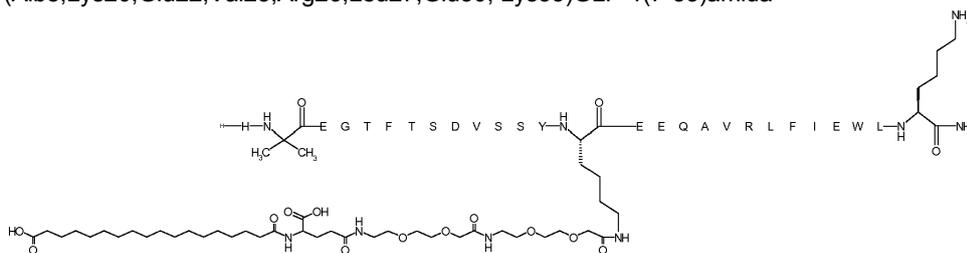
La estructura se confirmó por MALDI-MS

30

PM calculado = 3056.4

Ejemplo 2

35 N épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Glu30,Lys33)GLP-1(7-33)amida

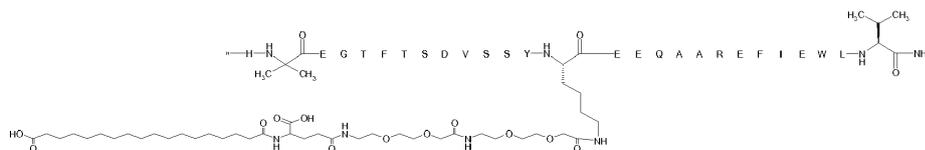


40 Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.
HPLC (Método 02_B6_1):

45 RT = 32 min
MALDI-MS = 3901
PM calculado = 3900.5

Ejemplo 3

50 N épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Arg26,Glu30) GLP-1(7-33)amida



5 Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS. HPLC (Método 02_B6_1):

10 RT = 32.9 min
MALDI-MS = 3858.7
PM calculado = 3859.3

Ejemplo 4

15 [Glu22,Val25,Arg26] GLP-1 (7-33)amida
NH₂-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A V R E F I A W L - V-NH₂

Método de preparación: A

20

HPLC (Método 03_A1_1)
RT = 44.6 min
LCMS: m/z = 1029.2 (M+3H)³⁺
25 PM calculado = 3084.4

Ejemplo 5

[Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Glu30] GLP-1 (7-33)amida

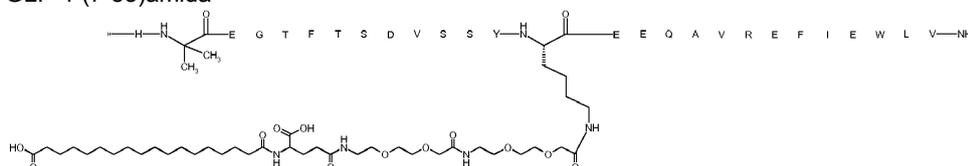


Método de preparación: B

35 El péptido se eluyó a 60% de acetonitrilo.
La estructura se confirmó por MALDI-MS
PM calculado = 3171.5

Ejemplo 6

40 N épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil}-[Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Glu30]
GLP-1 (7-33)amida



45 Método de preparación: B

El péptido se eluyó a 70% de acetonitrilo.
La estructura se confirmó por MALDI-MS
PM calculado = 3887.4

50 Ejemplo 7

[Glu22, Arg26]GLP-1(7-33)péptido
H-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A A R E F I A W V-OH

Método de preparación: A

5

HPLC (método B6):

RT = 28.09 min LCMS: m/z = 1020 (M+3H)³⁺

PM calculado = 3057.3

10

Ejemplo 8

[Glu22, Val25, Arg26] GLP-1 (7-32)amida
NH₂-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A V R E F I A W L-NH₂

15

Método de preparación: A

HPLC (Método 03_A1_1)

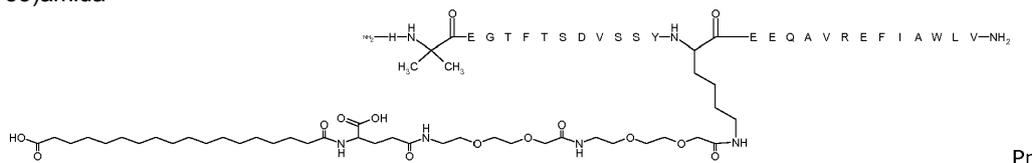
RT = 41.9 min

20 LCMS: m/z = 996.0 (M+3H)³⁺

PM calculado = 2985.3

Ejemplo 9

25 N-épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil)-(Aib8, Lys20, Glu22, Arg26) GLP-1(7-
33)amida



Pr

30 Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y LC-MS.

HPLC (Método 02_B6_1):

35

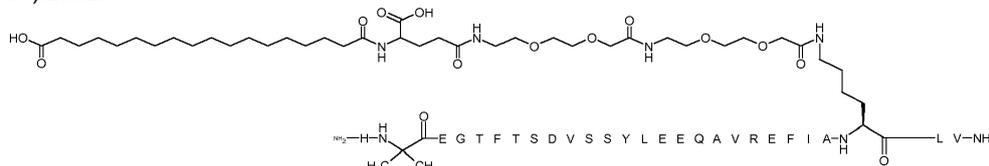
RT= 34.31 min

LCMS: m/z = 1277 (M + 3H)³⁺

PM calculado = 3831

40 Ejemplo 10

N-épsilon31 {2-(2-{2-[2-(2-{4-carboxi-4-(17-carboxi-
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil)-(Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31) GLP-1(7-
33)amida



45

Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y LC-MS.

50 HPLC (Método 02_B6_1):

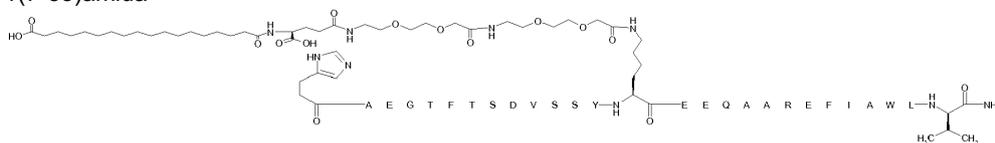
RT= 34.02 min

LCMS: m/z = 1253 (M + 3H)³⁺

PM calculado = 3759

Ejemplo 11

5 N-épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil)-(DesaminoHis7,Lys20,Glu22,Arg26) GLP-
1(7-33)amida



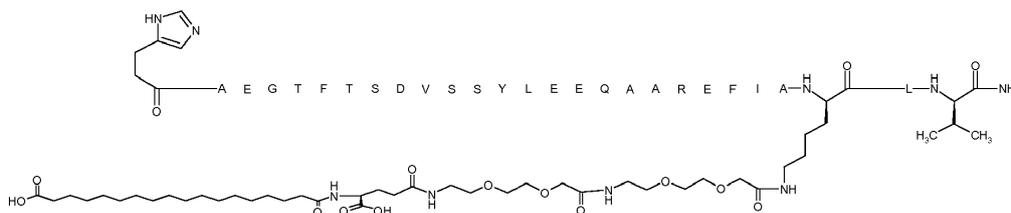
10 Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y LC-MS.

HPLC (Método 02_B6_1):

15 RT= 33.3 min
LCMS: m/z = 1257.7 (M + 3H)³⁺
PM calculado = 3773

Ejemplo 12

20 N-épsilon31 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil)-(DesaminoHis7,Glu22,Arg26,Lys31)GLP-
1(7-33)amida



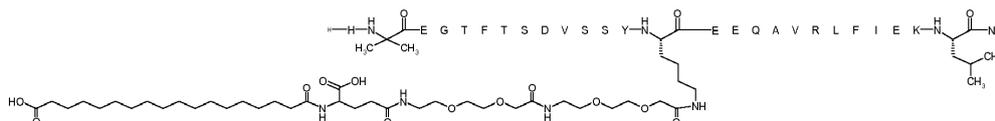
25 Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y LC-MS.

30 HPLC (Método 02_B6_1):

35 RT= 33.2 min
LCMS: m/z = 1233.9 (M + 3H)³⁺
PM calculado = 3699

Ejemplo 13

40 N-épsilon20 {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,
Glu30,Lys31)GLP-1(7-32)amida



45 Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

HPLC (Método 02_B6_1):

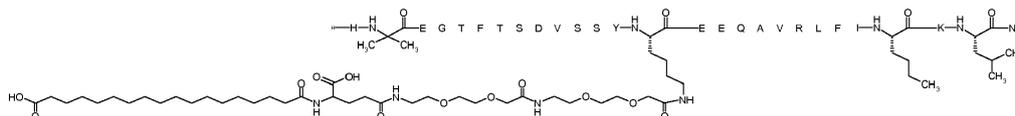
50

RT= 32.6 min
MALDI-MS: 3715.5
PM calculado = 3714.3

5 Ejemplo 14

N-épsilon20
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-
Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Nle30,Lys31]GLP-1(7-32)amida {2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-
(Aib8,

10



15

Método de preparación: Método C excepto que el péptido se preparó en un equipo Apex396 de Advanced Chemtech usando un exceso molar de 8-10 veces de aminoácido, DIC y HOAt/HOBt (1:1) y el grupo protector Mtt se eliminó con hexafluoroisopropanol. El producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

HPLC (Método 02_B6_1):

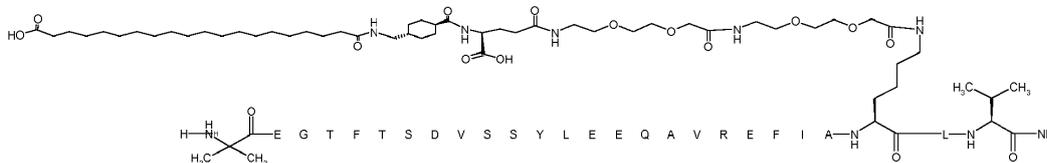
20

RT= 33 min
MALDI-MS: 3696.9
PM calculado = 3698

Ejemplo 15

25 N-épsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{2-[(S)-4-carboxi-4-({trans-4-[(19-carboxinonadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil]amino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil]-
[AibB, Glu22,Val25,Arg26,Lys31]GLP-1-(7-33)amida

30



35

HPLC (Método 02_B6_1):

RT= 39.3 min
MALDI-MS: 3696.9
PM calculado = 3698

40

Ejemplo 16

[Desamino His7, Glu22, Arg26]-GLP-1 (7-34)

45



HPLC (Método I_BDSB2)

RT = 5.65 min
 LCMS: m/z = 1057.5 (M+3H)³⁺
 PM calculado = 3170.5

5 Ejemplo 17

[Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Lys31]GLP-1 (7-32)amida



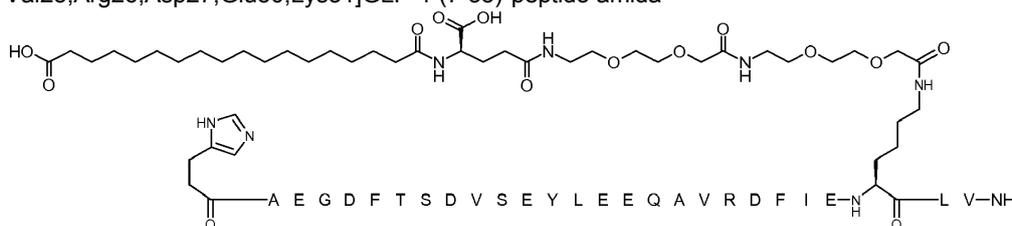
10 Preparación análoga al método B de SPPS.

HPLC método 02_B6_1:

RT = 27.09 min
 LCMS: m/z = 735 (M+4H)⁴⁺
 (M) calculada = 2940.3

Ejemplo 18

20 N-épsilon31-[2-(2-{2-[2-(2-{(S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil][DesaminoHis7,Asp11,Glu18,Glu22,Val25,Arg26,Asp27,Glu30,Lys31]GLP-1 (7-33)-péptido amida



25 Preparación método B en resina Rink Amida ChemMatrix (0.24 mmol/g, 0.4 g).

HPLC (02_B4_4): Rt = 10,649 min; 99.6 % de pureza
 HPLC (03_A3_1): Rt = 8.491 min; 94.3 % de pureza
 MALDI-MS: ácido alpha-ciano-4-hidroxicinámico m/z: 3824.543 (MODO NEGATIVO)

30 Ejemplo 19

[Aib8,Glu22,Val25, Lys31]GLP-1(7-33)-amida



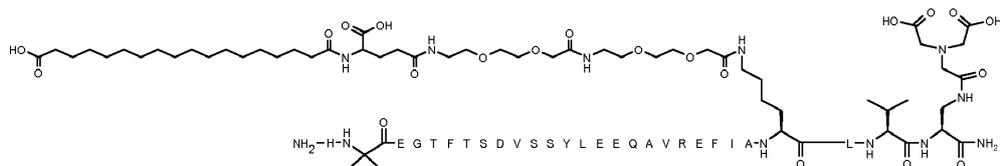
35 Método de preparación: El péptido se preparó por el método C de SPPS y el producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

HPLC (02-B6-1): RT= 31.5 min
 HPLC (04-A3-1): RT= 8.6 min
 MALDI-MS: 3043.6

40 PM calculado = 3040.4

Ejemplo 20

45 N-épsilon31-heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi}etoxi)acetilamino]etoxi}etoxi)acetil}-N-beta34-(2-(bis-carboximetilamino)acetil)[Aib8,Glu22,Val25,Arg26,Lys31,Dap34] GLP-1(7-34)amida



Método de preparación: El péptido se preparó por el método C de SPPS y el producto final se caracterizó por HPLC analítica y MALDI-MS.

- 5 HPLC (02-B6-1): RT= 36.7 min
 HPLC (A4-A3-1): RT= 8.9 min
 MALDI-MS: 4015.9
 PM calculado = 4015.5

10 Hallazgos biológicos

Prolongación de la acción de los derivados de GLP-1 después de la administración i.v. o s.c.

- 15 La prolongación de la acción de una serie de compuestos de GLP-1 de la invención se determina monitoreando la concentración plasmática de éstos luego de la administración sc a cerdos sanos, usando los métodos descritos a continuación. A efectos de comparar se sigue la concentración plasmática de GLP-1(7-37) luego de la administración sc. La prolongación de la acción de otros compuestos de GLP-1 de la invención se puede determinar de la misma manera.

20 Análisis farmacocinético de los análogos de GLP-1 en minicerdos

Las sustancias de prueba se disolvieron en un vehículo adecuado para la administración subcutánea o intravenosa. La concentración se ajustó para que el volumen de dosificación fuera de aproximadamente 1 ml.

- 25 El estudio se llevó a cabo en 12 minicerdos Göttingen machos de Ellegaard Göttingen Minipigs ApS. Se permitió un período de aclimatación de aproximadamente 10 días antes de que los animales ingresaran en el estudio. Al comienzo del período de aclimatación los minicerdos tenían alrededor de 5 meses de edad y un intervalo de peso de 8-10 kg.

- 30 El estudio se condujo en una habitación para animales adecuada con una temperatura ambiente fijada a 21-23 °C y una humedad relativa a $\geq 50\%$. La habitación se iluminó de modo de proporcionar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La iluminación de 06.00 a 18.00 h. Los animales se alojaron en corrales con paja como lecho, seis en cada corral.

- 35 Los animales tuvieron acceso libre a agua para beber de calidad doméstica durante el estudio, pero se mantuvieron en ayunas desde aproximadamente las 4 p.m. del día anterior a la administración hasta aproximadamente 12 horas después de la administración.

Los animales se pesaron al llegar y los días de administración de la dosis.

- 40 Los animales recibieron una única inyección intravenosa o subcutánea. La inyección subcutánea se administró en el lado derecho del cuello, aproximadamente a 5-7 cm de la oreja y a 7-9 cm del centro del cuello. Las inyecciones se administraron con un tapón de goma en la aguja, permitiendo introducir 0.5 centímetros de la misma

- 45 Cada sustancia de prueba se administró a tres animales. Cada animal recibió una dosis de 2 nmol/kg de peso corporal.

Se dosificaron 6 animales por semana mientras los restantes seis se dejaban descansar.

- 50 Se obtuvo un perfil completo de concentración plasmática-tiempo para cada animal. Las muestras de sangre se extrajeron según el cronograma siguiente:

Luego de la administración intravenosa:

- 55 Predosis (0), 0.17 (10 minutos), 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección.

Luego de la administración subcutánea:

Predosis (0), 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección. En cada tiempo de toma de

muestra, se extrajeron 2 ml de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se extrajeron de la vena yugular.

Las muestras de sangre se recogieron en tubos de prueba que contenían un tampón para la estabilización a fin de evitar la degradación enzimática de los compuestos de GLP-1.

5 El plasma se transfirió inmediatamente a tubos Micronic. Se transfirieron aproximadamente 200 µl de plasma a cada tubo Micronic. El plasma se almacenó a -20 °C hasta que se analizó. Se determinó el contenido de compuestos de GLP-1 en las muestras de plasma usando un inmunoensayo.

10 Los perfiles de concentración plasmática-tiempo se analizaron mediante un análisis farmacocinético no compartimental. En cada ocasión se calcularon los parámetros farmacocinéticos siguientes: AUC, AUC/Dosis, AUC%Extrap, C_{máx}, t_{máx}, λ_z, t_{1/2}, CL, CL/f, V_z, V_z/f y MRT. Compuestos elegidos de la invención se probaron en cerdos Danish Landrace.

15 Análisis farmacocinético de los compuestos de GLP-1 en cerdos

Se dejaron en ayunas cerdos (50% Duroc, 25% Yorkshire, 25% Danish Landrace, de aproximadamente 40 kg) desde el comienzo del experimento. A cada cerdo se le administró 0.5 nmol del compuesto de prueba por kg de peso corporal en una solución isotónica 50 µM (fosfato 5 mM, pH 7.4, 0.02% de Tween[®]-20 (Merck), 45 mg/ml de manitol (A piógeno, Novo Nordisk). Las muestras de sangre se extrajeron con un catéter en la vena yugular. Se vertieron 5 ml de las muestras de sangre en recipientes de vidrio refrigerados que contenían 175 µl de la solución siguiente: EDTA 0.18 M, 15000 KIE/ml aprotinina (Novo Nordisk) y Valina-Pirrolidida 0.30 mM (Novo Nordisk), pH 7.4. En el correr de 30 min, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 5-6000*g. La temperatura se mantuvo a 4 °C. El sobrenadante se transfirió con pipeta a diferentes recipientes de vidrio y se mantuvo a -20 °C hasta que se usó.

20 Las concentraciones plasmáticas de los péptidos se determinaron en un ELISA sándwich o por RIA usando anticuerpos mono o policlonales diferentes. La elección de los anticuerpos depende de los compuestos de GLP-1. El tiempo al cual se logra la concentración plasmática máxima varía dentro de amplios límites, dependiendo del compuesto de GLP-1 particular elegido.

30 Protocolo del ensayo general para ELISA sándwich en microplacas de 96 pocillos

Tampón de recubrimiento, PBS : Solución salina tamponada con fosfato, pH 7.2

Tampón de lavado (PBS de lavado) : Solución salina tamponada con fosfato, 0.05% v/v de Tween 20, pH 7.2

Tampón del ensayo (tampón de ensayo) : Solución salina tamponada con fosfato, 10 g/l de seroalbúmina bovina (Fluka BSA) 05477), 0.05% v/v de Tween 20, pH 7.2

Tampón con estreptavidina : Solución salina tamponada con fosfato, NaCl 0.5 M, 0.05% v/v de Tween 20, pH 7.2

Estándar : Compuestos individuales en matriz de plasma

A-TNP : Anticuerpos sin sentido

AMDEX : Estreptavidina-peroxidasa de rábano (Amersham RPN4401V)

Sustrato TMB : 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (<0.02%), peróxido de hidrógeno

35 El ensayo se llevó a cabo de la manera siguiente (volumen/pocillo):

1.) Se recubrió con 100 µl de anticuerpo de captura 5 µg/ml en tampón de PBS

- 40
- se incubó toda la noche, 4 °C
 - 5 x PBS de lavado
 - se bloqueó con el último lavado en 30 minutos mínimo
 - después se vació la placa

45 2.) 20 µl de muestra + 100 µl de anticuerpo de detección biotinilado 1 µg/ml en tampón de BSA con 10 µg/ml de A-TNP

- se incubó 2 h, a temperatura ambiente, en un agitador 5 x PBS de lavado, después se vació la placa

3.) 100 µl de AMDEX 1:8000 en tampón con estreptavidina

ES 2 550 363 T3

- se incubó 45-60 minutos, a temperatura ambiente, en un agitador
- 5 x PBS de lavado, después se vació la placa
- 4.) 100 µl de sustrato TMB
-
- se incubó x minutos a temperatura ambiente en un agitador
- se detuvo la reacción con 100 µl de H₃PO₄ 4 M

Se leyó la absorbancia a 450 nm con 620 nm como referencia

La concentración en las muestras se calculó a partir de las curvas estándar.

Protocolo para el ensayo general de RIA

Tampón de DB: tampón de fosfato 80 mM, 0.1% de seroalbúmina humana, EDTA 10 mM, tiomersal 0.6 mM, pH 7.5

Tampón de FAM: tampón de fosfato 40 mM, 0.1% de seroalbúmina humana, tiomersal 0.6 mM, pH 7.5

Carbón: tampón de fosfato 40 mM, tiomersal 0.6 mM, 16.7% de plasma bovino, 15 g/l de carbón activado, pH 7.5 (mezclar la suspensión mínimo 1 h antes de usar a 4 °C)

Estándar: compuestos individuales en una matriz de plasma

El ensayo se llevó a cabo en tubos minisorp de 12 x 75 mm (volumen/tubo) de la manera siguiente:

	Tampón de DB	MUESTRA	Anticuerpo:	Tampón de FAM	Trazador	Carbón	H ₂ O
Día 1							
TOTAL					100 µL		
NSB	330 µL			100 µL			
Muestra	300 µL	30 µL	100 µL		100 µL		
Se mezcló, se incubó toda la noche a 4 °C							
Día 2							
TOTAL							1.5 mL.
NSB						1.5 mL.	
Muestra						1.5 mL.	

Se mezcló, se incubó 30 min a 4 °C, se centrifugó a 3000 rpm, 30 min -inmediatamente después se transfirieron los sobrenadantes a tubos nuevos, se cerraron con tapón de goma y se contaron en un contador gamma durante 1 minuto.

La concentración en las muestras se calculó a partir de las curvas estándar individuales.

Ensayo de radio receptor (RRA) de GLP-1:

El método es un ensayo radiométrico de unión ligando-receptor utilizando partículas para imagenología LEADseeker. El ensayo se compone de fragmentos de membranas que contienen el receptor de GLP-1, análogos de GLP-1 sin marcar, GLP-1 humano marcado con ¹²⁵I y partículas PS LEADseeker recubiertas con aglutinina de germen de trigo (WGA). El GLP-1 frío y marcado con ¹²⁵I competirá por la unión al receptor. Las partículas LEADseeker una vez agregadas se unirán a los residuos de carbohidratos de los fragmentos de membranas a través de los residuos de WGA. La proximidad entre las moléculas marcadas con ¹²⁵I y las partículas LEADseeker causa la emisión de luz desde las partículas. El LEADseeker tomará imágenes de la luz emitida y se correlacionará reversiblemente con la cantidad de análogo de GLP-1 presente en la muestra.

Materiales y reactivos:

Pretratamiento de plasma animal: El plasma animal se trató con calor durante 4 h a 56 °C y se centrifugó a 10 000 rpm durante 10 minutos. A continuación, se agregaron Val-Pyr (10 µM) y aprotinina (500 KIE/mL) y se almacenó a <-18 °C hasta que se utilizó.

ES 2 550 363 T3

Calibradores de análogos de GLP-1: se agregaron cantidades conocidas de análogos de GLP-1 al plasma tratado con calor para producir líneas de dilución que variaran desde aproximadamente 1 μM hasta 1 pM.

- 5 Tampón del ensayo de RRA para GLP-1: Na-HEPES 25 mM (pH=7.5), CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 1 mM, NaCl 50 mM, 0.1% de ovoalbúmina, 0.003% de Tween 20, 0.005% de bacitracina, 0.05% de NaN_3 .

10 Suspensión del receptor de GLP-1: Se purificaron fragmentos de membranas con receptor de GLP-1 de células de riñón de hámster recién nacido (BHK) que expresaban establemente el receptor de GLP-1 pancreático humano. Se almacenó a <-80 °C hasta que se usó.

Perlas de imagenología LEADseeker de poliestireno acopladas a WGA (RPNQ0260, Amersham): Las perlas se reconstituyeron con tampón de ensayo de RRA para GLP-1 hasta una concentración de 13.3 mg/mL. Después se agregó la suspensión de membranas con receptor de GLP-1 y se incubó en frío (2-8 °C) invirtiendo durante al menos 1 h antes de usar.

15 [^{125}I]-GLP-1(7-36)amida (Novo Nordisk A/S): Se almacenó a <-18 °C hasta que se usó.

Etanol 99.9% vol (De Dansk Spritfabrikker A/S): Se almacenó a <-18 °C hasta que se usó.

20 Placas de PTFE hidrófobas MultiScreen® Solvinert de 0.45 μm (MSRPN0450, Millipore Corp.)

Placas de polipropileno (N° de cat. 650201, Greiner Bio-One)

25 Placas de poliestireno blancas de 384 pocillos (N° de cat. 781075, Greiner Bio-One)

Aparato:

Mezclador de placas horizontal

30 Centrífuga con un conjunto de rotor para placas de microtitulación con cuba de agitación

Concentrador de muestras por secado UltraVap (Porvair)

35 Sistema de imagenología multimodalidad LEADseeker™ (Amersham)

Procedimiento de análisis:

Preparación de la muestra:

40 Monte la placa de filtro Solvinert MultiScreen® en una placa receptora químicamente compatible (es decir placas de polipropileno) para recoger el filtrado.

45 Agregue 150 μL de etanol helado al 99.9% en los pocillos vacíos de la placa de filtro Solvinert MultiScreen® seguido de 50 μL de calibrador o de muestra de plasma. Coloque la tapa de almacenamiento sobre la placa de filtro.

Incube 15 minutos a 18-22 °C en un mezclador de placas horizontal.

50 Coloque el conjunto de filtro y placa receptora, con la tapa, en un rotor de placas de microtitulación con cuba de agitación estándar. Después recoja el filtrado en los pocillos vacíos de la placa receptora a 1500 rpm durante 2 minutos.

55 Seque el filtrado utilizando el UltraVap con N_2 calentado (40°C) durante 15 minutos. Reconstituya el material seco agregando 100 μL del tampón del ensayo de RRA para GLP-1 en cada pocillo. Incube durante 5 minutos en un mezclador horizontal.

Ensayo de radio receptor de GLP-1:

Use el esquema de transferencia con pipeta siguiente y placas de poliestireno blancas de 384 pocillos:

- 60
- 35 μL de tampón del ensayo de RRA para GLP-1:
 - 5 μL de filtrado reconstituido.
 - 10 μL de [^{125}I]-GLP-1(7-36)amida. La solución madre se diluye en tampón del ensayo de RRA para GLP-1 hasta 20 000 cpm/pocillo antes de usar.

- 15 µL de fragmentos de membranas con receptor de GLP-1 (≈0.5 µg/pocillo) depositados previamente sobre perlas de imagenología LEADseeker de poliestireno-WGA (0.2 mg/pocillo)

Selle las placas e incúbelas toda la noche a 18-22 °C

5 La emisión de luz desde cada pocillo es detectada utilizando el sistema de imagenología multimodalidad LEADseeker™ durante 10 minutos.

10 Ejemplo 21: Estimulación de la formación de cAMP en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado

15 Se determinaron las potencias de varios análogos y derivados de GLP-1 de la invención (los compuestos de los ejemplos 1-7, 9-17 y 19-20) como se describe más adelante, es decir, como la estimulación de la formación de AMP cíclico (cAMP) en un medio que contiene el receptor de GLP-1 humano. A efectos de comparar, también se determinó la potencia de GLP-1(7-33) truncado, natural humano.

20 Se estimularon membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transinfectada estable, BHK467-12A (tk-ts13), que expresaba el receptor de GLP-1 humano, con el compuesto de GLP-1 en cuestión, y la potencia de la producción de cAMP se midió usando el kit del ensayo de cAMP AlphaScreen™ de Perkin Elmer Life Sciences.

25 Se preparó una línea celular transinfectada estable en NN A/S, Dinamarca, y para el cribado se eligió un clon con alta expresión. Las células se cultivaron en 5% de CO₂ en DMEM, 5% de FCS, 1% de Pen/Strep (penicilina/estreptomina) y 0.5 mg/ml del marcador de selección G418.

30 Se lavaron células con aproximadamente 80% de confluencia 2 X con PBS (solución salina tamponada con fosfato) y se recogieron con Versene (solución acuosa de la sal tetrasódica del ácido etilendiaminotetraacético), se centrifugaron 5 min a 1000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Los pasos adicionales se hicieron todos en hielo. El sedimento celular se homogeneizó mediante el Ultrathurax durante 20-30 s en 10 ml de tampón 1 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 10 mM, pH = 7.4), se centrifugó 15 min a 20 000 rpm y el sedimento se resuspendió en 10 ml de tampón 2 (Na-HEPES 20 mM, EDTA 0.1 mM, pH = 7.4). La suspensión se homogeneizó durante 20-30 s y se centrifugó 15 minutos a 20 000 rpm. La suspensión en tampón 2, la homogeneización y la centrifugación se repitieron una vez y las membranas se resuspendieron en tampón 2 y estuvieron prontas para el análisis posterior o se almacenaron a -80 °C.

35 El ensayo funcional del receptor se llevó a cabo midiendo la producción de cAMP inducida por el péptido mediante The AlphaScreen Technology. El principio básico de The AlphaScreen Technology es una competencia entre el cAMP endógeno y cAMP-biotina agregado exógenamente. La captura de cAMP se logra empleando un anticuerpo específico conjugado a perlas aceptoras. El cAMP formado se contó y se midió en un analizador de microplacas AlphaFusion. Los valores de CE₅₀ se calcularon usando el software Graph-Pad Prisme software (versión 5).

40 El péptido GLP-1(7-33) truncado natural tiene una muy baja potencia (un valor de CE₅₀ elevado de 11.3 nM). Todo los compuestos de GLP-1 de la invención tienen una muy alta potencia (seis compuestos una CE₅₀ inferior a 0.10 nM, y CE₅₀ en el intervalo de 0.10-0.50 nM).

45 Curiosamente los compuestos de los ejemplos 1, 4, 5 y 7, ninguno de los cuales está derivatizado, también tienen una CE₅₀ inferior a 0.30 nM, lo que es extremadamente sorprendente.

Ejemplo 22: Unión al dominio extracelular del receptor de GLP-1

50 Para varios compuestos de GLP-1 de la invención (los compuestos de los ejemplos 1-17), la afinidad de la unión al dominio extracelular N-terminal aislado del receptor GLP-1R (nGLP-1R) se midió como se describe a continuación. A efectos de comparar, también se determinó la potencia de GLP-1(7-33) truncado, natural humano.

55 La afinidad es una medida de la capacidad del derivado de GLP-1 en cuestión para desplazar ¹²⁵I-Exendina-4(9-39) de la unión a nGLP-1R, y la unión a nGLP-1R se midió en el ensayo siguiente: La proteína nGLP-1R se preparó como describieron Runge et al 2007 (en Biochemistry, vol. 46, pp. 5830-5840), se biotiniló e inmovilizó en perlas de SPA recubiertas de estreptavidina. La nGLP1R en NaHCO₃ 0.1M se biotiniló usando 75 µg de BNHS (Sigma H1759) para 1 mg de proteína. A continuación la nGLP1R biotinilada se dializó contra PBS. Todos los reactivos y derivados se diluyeron en PBS con 0.05% v/v de Tween 20. El ensayo de unión se llevó a cabo en placas de 96 pocillos OptiPlates (PerkinElmer 6005290) en un volumen final de 200 µl. Cada pocillo contuvo 2 mg de perlas de SPA recubiertas con estreptavidina (PerkinElmer RPNQ007), 0.1 pmol de nGLP1R biotinilada, 50 pCi de ¹²⁵I-Exendina (9-39) y el péptido de prueba en concentraciones finales que variaron de 1000 nM a 0.064 nM. Las placas se incubaron en un agitador a temperatura ambiente durante 3 horas. Las partículas de SPA se sedimentaron por centrifugación

durante 10 min a 1500 rpm y las placas se contaron en un TopCount-NXT (PerkinElmer).

El valor de CI_{50} se lee a partir de la curva respectiva como la concentración del compuesto de GLP-1 en cuestión que desplaza 50% de ^{125}I -Exendin-4(9-39) de la unión a nGLP-1R.

5 La afinidad de GLP-1(7-33) truncado (natural, humano) por nGLP-1R (CI_{50}) se determinó a 886 nM. Once de los compuestos de GLP-1 analizados de la invención tuvieron afinidades (CI_{50}) inferiores a 600 nM (que variaron entre 20 y 556 nM), con seis compuestos por debajo de 100 nM. Varios compuestos de GLP-1 de la invención mostraron
10 Concordantemente una muy buena afinidad de unión al extremo N-terminal del receptor de GLP-1 (cuanto menor el valor de CI_{50} , mayor la unión). Los compuestos 1, 4, 5 y 7 que fueran examinados en el ejemplo 21 tuvieron afinidades de unión aceptables en el intervalo de 200-1500 nM, tres de ellos en el intervalo de 200-600 nM.

Ejemplo 23: Afinidad por el receptor de GLP-1

15 La afinidad de unión una serie de compuestos de GLP-1 de la invención (compuestos de los ejemplos 1-7 y 9-18) por el receptor de GLP-1 humano se midió por su capacidad para desplazar ^{125}I -GLP-1 del receptor.

Condiciones

20

Especie (*in vitro*): hámster
Criterio de evaluación biológico: unión al receptor
Método de ensayo: SPA
25 Receptor: receptor de GLP-1
Línea celular: BHK tk- ts13

Purificación de la membrana:

30 Se lavaron las células (aprox. 80% de confluencia) dos veces en PBS y se recogieron (PBS + EDTA o Versene), luego de lo cual se separaron por centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Las células/el sedimento de células se mantuvieron en hielo en la medida de lo posible en los pasos siguientes. El sedimento de células se homogeneizó con Ultrathurax durante 20-30 segundos en una cantidad adecuada de tampón 1 (dependiendo de la cantidad de células, pero por ej. 10 ml). El homogeneizado se centrifugó a 20 000 rpm durante 15 minutos. El sedimento se
35 resuspendió (homogeneizó) en 10 ml de tampón 2 y se volvió a centrifugar. Este paso se repitió una vez más. El sedimento resultante se resuspendió en tampón 2 y se determinó la concentración de proteína. Las membranas se almacenaron a -80 °C

40 Tampón 1: Na-HEPES 20 mM + EDTA 10mM, pH 7.4
Tampón 2: Na-HEPES 20 mM + EDTA 0.1 mM, pH 7.4

Ensayo de unión:

45 SPA:

Los compuestos de prueba/péptidos, las membranas, las partículas de SPA y ^{125}I se diluyeron en tampón de ensayo. Se agregaron 25 μ l (microlitros) de los compuestos de prueba/péptidos a la Optiplat. Se agregó tampón (50 μ l). Se agregaron 5-10 μ g de proteína/muestra (50 μ l) correspondientes a 0.1-0.2 mg de proteína/ml (a ser optimizado preferentemente para cada preparación de membrana). Se agregaron partículas de SPA (perlas de SPA aglutinina de germen de trigo) RPNQ 0001) 0.5 mg/pocillo (50 μ l). Se inició la incubación con ^{125}I -GLP-1 (concentración final 0.05 nM correspondiente a 49.880 DPM, 25 μ l). Las placas se sellaron con PlateSealer. Se incubaron durante 120 minutos a 30 °C agitando. Las placas se centrifugaron (1500 rpm, 10 min) y se contaron en Topcounter.

55 Tampón de ensayo: HEPES 50 mM
EGTA 5 mM
MgCl₂ 5 mM
0.005% de Tween 20
pH 7.4

60 El valor de CI_{50} se lee de la curva como la concentración que desplaza 50% de ^{125}I -GLP-1 del receptor.

El valor de CI_{50} de GLP-1(7-33) (GLP-1 truncado natural) fue de 241 nM. Excepto un compuesto, todos los compuestos probados de la invención tuvieron una mejor unión al receptor de GLP-1 (es decir un menor valor de CI_{50}). Seis compuestos tuvieron un valor inferior a 1.00 nM, cinco compuestos en el intervalo de 1-10 nM, y cinco

compuestos en el intervalo de 20-200 nM. Los compuestos 1, 4, 5 y 7 examinados en los ejemplos previos tuvieron valores de CI_{50} en el intervalo de 0.24 nM a 44 nM, y tres de ellos inferiores a 2.0 nM.

LISTADO DE SECUENCIAS

5 [0414]
 <110> Novo Nordisk A/S
 <120> Derivados truncados de GLP-1 y su uso terapéutico
 <130> 7695.204-WO
 10 <160> 3
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 < 211> 29
 <212> PRT
 15 < 213> Homo sapiens
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 < 222> (1)..(29)
 <400> 1
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly
 20 20 25
 <210> 2
 < 211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 < 223> Fórmula I (análogos de GLP-1)
 <220>
 <221> PÉPTIDO
 < 222> (1)..(29)
 30 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (1) .. (1)
 < 223> Xaa7 es L-his, D-his, desamino-his, 2-amino-his, beta-hidroxi-his, homohis, N alfa-acetil-his, alfa-fluorometil-
 his, alfa-metil-his, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina
 35 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (2)..(2)
 < 223> Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil, -butil-, -pentil-, -hexil-, -heptil- u -
 octil)carboxílico
 40 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (3)..(3)
 < 223> Xaa9 es Glu o un derivado de Glu como alfa, alfa dimetil-Glu
 <220>
 45 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (10)..(10)
 < 223> Xaa16 es Val o Leu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 50 < 222> (12)..(12)
 < 223> Xaa18 es Ser, Lys, Cys o Arg
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (14) .. (14)
 55 < 223> Xaa20 es Leu, Lys o Cys
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (17)..(17)
 < 223> Xaa23 es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
 60 <220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (18)..(18)
 < 223> Xaa24 es Ala o Asn
 <220>
 5 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (19)..(19)
 < 223> Xaa25 es Ala o Val
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 10 < 222> (21) .. (21)
 < 223> Xaa27 es Glu, Ala o Leu
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (24) .. (24)
 15 < 223> Xaa30 es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (25) .. (25)
 < 223> Xaa31 es Trp, Lys, Cys o está ausente
 20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (27) .. (27)
 < 223> Xaa33 es Val, Lys, Cys o está ausente
 <220>
 25 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (28) .. (28)
 < 223> Xaa34 es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 30 < 222> (29) .. (29)
 < 223> Xaa35 es Gly, Aib o está ausente;
 <400> 2
 Xaa Xaa Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Tyr Xaa Glu Glu
 1 5 10 15

 Xaa Xaa Xaa Arg Xaa Phe Ile Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa
 20 25
 <210> 3
 35 < 211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 < 223> Fórmula II (análogos de GLP-1)
 40 <220>
 <221> PÉPTIDO
 < 222> (1)..(29)
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 45 < 222> (1) .. (1)
 < 223> Xaa7 es L-his, D-his, desamino-his, 2-amino-his, beta-hidroxi-his, homohis, N alfa-acetil-his, alfa-fluorometil-
 his, alfa-metil-his, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 50 < 222> (2)..(2)
 < 223> Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil, -butil-, -pentil-, -hexil-, -heptil- u -
 octil)carboxílico
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 55 < 222> (12)..(12)
 < 223> Xaa18 es Ser, Lys o Arg
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 < 222> (24) .. (24)
 60 < 223> Xaa30 es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente

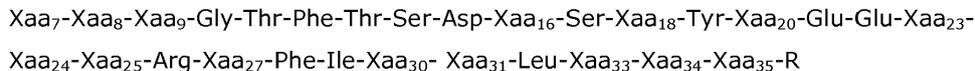
ES 2 550 363 T3

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (24) .. (24)
< 223> Xaa30 es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente
5 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (27) .. (27)
< 223> Xaa33 es Val, Lys o está ausente
<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (28) .. (28)
< 223> Xaa34 es Lys, Glu, Arg o está ausente
<220>
15 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
< 222> (29) .. (29)
< 223> Xaa35 es Gly, Aib o está ausente
<400> 3
Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Xaa Tyr Leu Glu Glu
1 5 10 15

Gln Ala Ala Arg Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un análogo de GLP-1 que es GLP-1(7-35) (SEQ ID N° 1) modificado que tiene la secuencia de fórmula (I)



Formula (I) (SEQ ID No: 2)

5 en la que

Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
10 Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
Xaa₉ es Glu o un derivado de Glu como alfa,alfa-dimetil-Glu;
Xaa₁₆ es Val o Leu;
15 Xaa₁₈ es Ser, Lys, Cys o Arg;
Xaa₂₀ es Leu, Lys o Cys;
Xaa₂₃ es Gln, Glu, Lys, Cys o Arg;
Xaa₂₄ es Ala o Asn;
Xaa₂₅ es Ala o Val;
20 Xaa₂₇ es Glu, Ala o Leu;
Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
Xaa₃₁ es Trp, Lys, Cys o está ausente;
Xaa₃₃ es Val, Lys, Cys o está ausente;
Xaa₃₄ es Lys, Glu, Asn, Arg, Cys o está ausente;
25 Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
R es amida o está ausente;
siempre que si Xaa₃₀, Xaa₃₁, Xaa₃₂, Xaa₃₃ o Xaa₃₄ está ausente entonces cada residuo de aminoácido en dirección 3' también está ausente;
y donde el análogo de GLP-1 tiene un total de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 sustituciones de aminoácidos en comparación
30 con GLP-1(7-35).

2. El análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el análogo de GLP-1 comprende

35 i) un grupo ácido carboxílico C-terminal; o ii) un grupo amida C-terminal.

3. El análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que se derivatiza con un residuo de unión a la albúmina o se pegila.

40 4. El análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el aminoácido en la posición 35 está ausente, y en el que la longitud total del análogo de GLP-1 es de 28 aminoácidos.

5. El análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que

45 (i) los aminoácidos en la posición 34 y 35 están ausentes, y donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 27 aminoácidos;
(ii) los aminoácidos en la posición 33, 34 y 35 están ausentes, y donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 26 aminoácidos;
(iii) los aminoácidos en la posición 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 25 aminoácidos;
50 (iv) los aminoácidos en la posición 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 24 aminoácidos; o
(v) los aminoácidos en la posición 30, 31, 32, 33, 34 y 35 están ausentes, y donde la longitud total del análogo de GLP-1 es de 23 aminoácidos;

55 6. El análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que tiene la secuencia de fórmula (II)

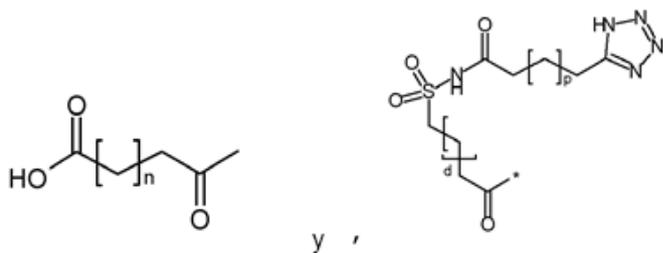
Xaa₇-Xaa₈-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa₁₈-Tyr-Leu-Glu-Glu-Gln-Ala-Ala-Arg-
Glu-Phe-Ile-Xaa₃₀-Trp-Leu-Xaa₃₃-Xaa₃₄-Xaa₃₅-R

Formula (II) (SEQ ID No: 3),

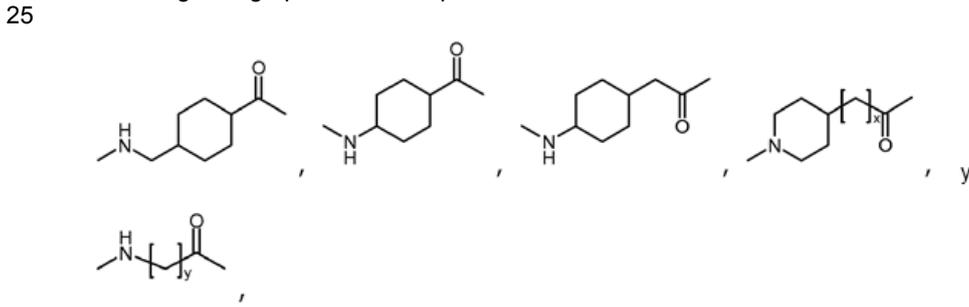
en la que

- 5 Xaa₇ es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, (3-hidroxi-histidina, homohistidina, N^α-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;
Xaa₈ es Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1-aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico;
10 Xaa₁₈ es Ser, Lys o Arg;
Xaa₃₀ es Ala, Glu, Lys, Arg o está ausente;
Xaa₃₃ es Val, Lys o está ausente;
Xaa₃₄ es Lys, Glu, Arg o está ausente;
Xaa₃₅ es Gly, Aib o está ausente;
R es amida o está ausente;

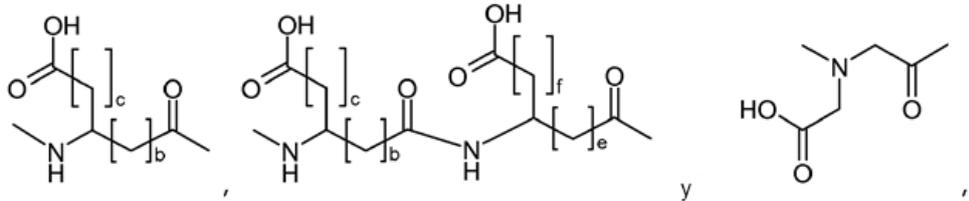
- 15 7. El análogo de GLP-1 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que al menos un residuo de aminoácido se derivatiza con A-B-C-D- en el que A- se elige del grupo constituido por:



- 20 donde n se elige del grupo constituido por 14, 15, 16, 17, 18 y 19, p se elige del grupo constituido por 10, 11, 12, 13 y 14, y d se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4 y 5,
-B- se elige del grupo constituido por



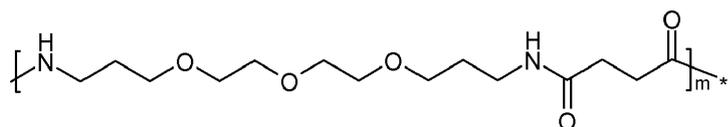
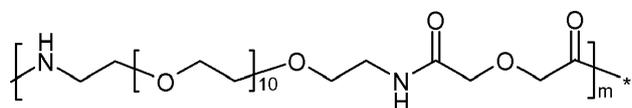
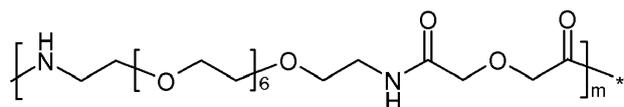
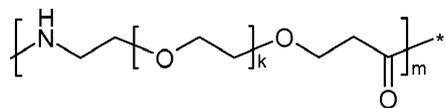
- 30 donde x se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3 y 4, e y se elige del grupo constituido por 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12,
-C- se elige del grupo constituido por



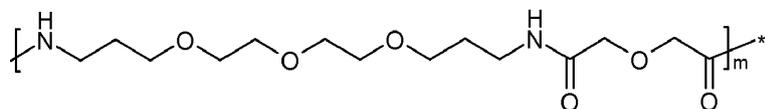
donde b y e se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2, y c y f se eligen cada uno independientemente del grupo constituido por 0, 1 y 2 con la condición de que b sea 1 o 2 cuando c es 0, o que b sea 0 cuando c es 1 o 2, y e sea 1 o 2 cuando f es 0, o e sea 0 cuando f es 1 o 2, y

5 - D- está unido al residuo de dicho aminoácido y es un conector.

8. El análogo de GLP-1 de acuerdo con la reivindicación 7, en el que D se elige del grupo constituido por



y



20 y donde k se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5, 11 y 27, y m se elige del grupo constituido por 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

9. Un análogo o derivado de GLP-1 que se elige entre los siguientes:

25 [Glu22,Arg26]GLP-1 (7-33)amida;

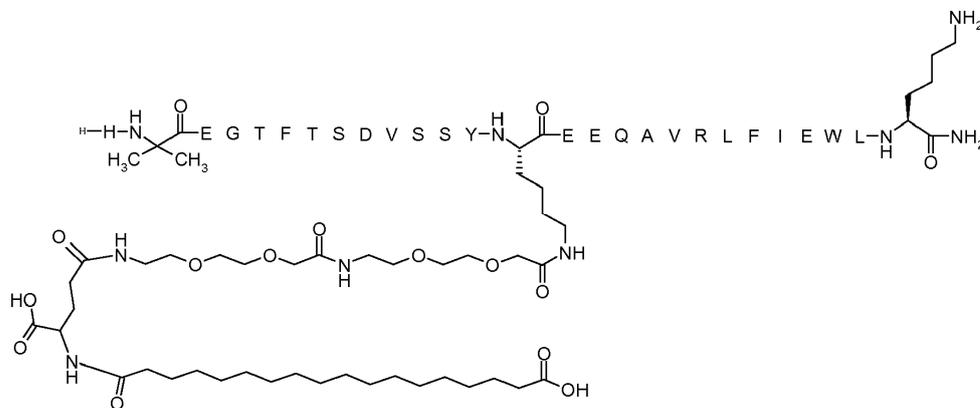
H-H A E G T F T S D V S S Y L E E Q A A R E F I A W L V-NH₂ ;

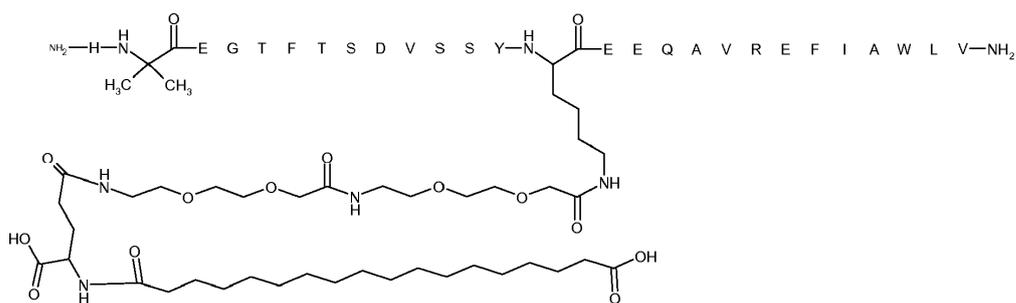
N épsilon20

{2-(2-{2-[2-(2-{2-[4-carboxi-4-(17-carboxi-

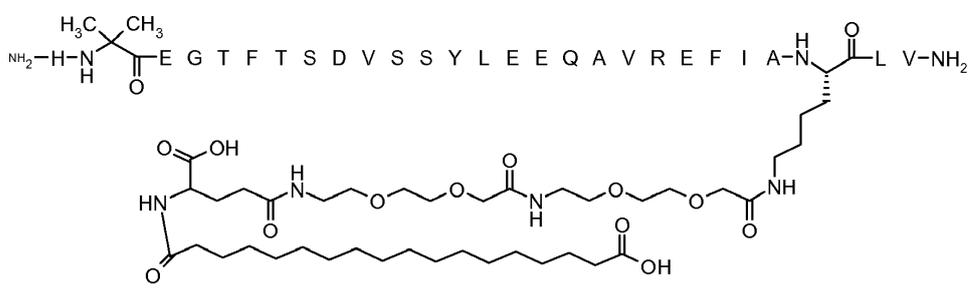
heptadecanoilamino)butirilamino]etoxi]etoxi]acetilamino]etoxi]etoxi]acetil)-

(Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Glu30, Lys33)GLP-1(7-33)amida;

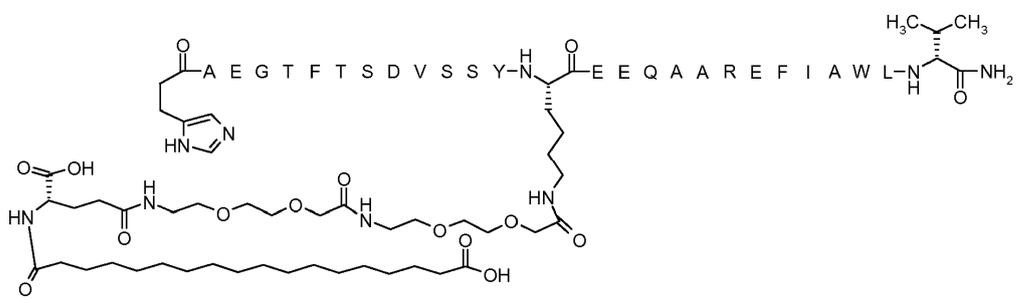




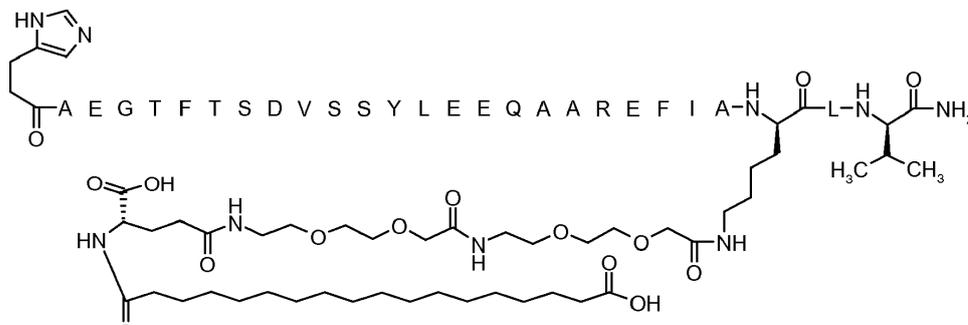
5 N-épsilon31 {2-(2-(2-(2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil)- (Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31) GLP-1(7-33)amida;



10 N-épsilon20 {2-(2-(2-(2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil)- (DesaminoHis7, Lys20, Glu22, Arg26) GLP-1(7-33)amida;

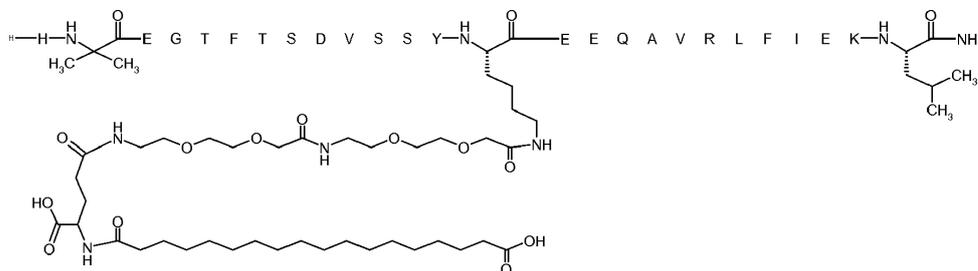


15 N-épsilon31 {2-(2-(2-(2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil)- (DesaminoHis7, Glu22, Arg26, Lys31) GLP-1(7-33)amida;



20

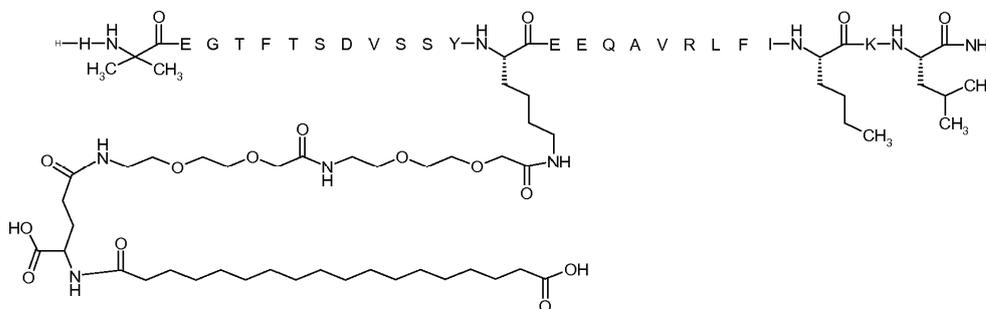
N-épsilon20 {2-(2-(2-(2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27, Glu30,Lys31)GLP-1(7-32)amida;



5 ;

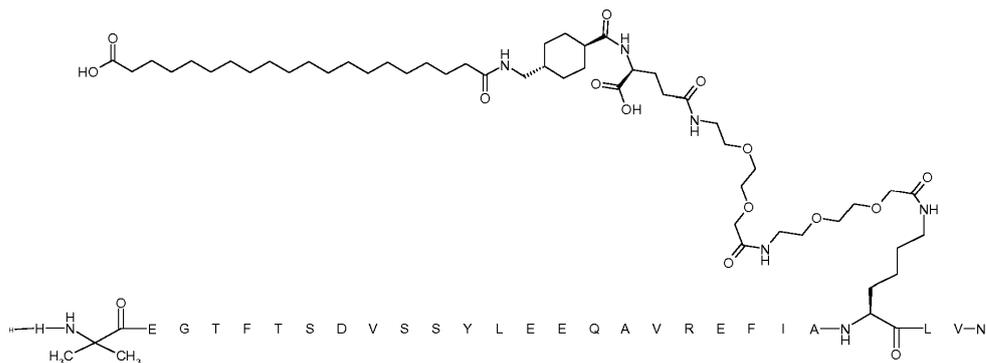
N-épsilon20 {2-(2-(2-(2-(2-[4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil)-(Aib8,Lys20,Glu22,Val25,Arg26,Leu27,Nle30,Lys31)GLP-1(7-32)amida;

10



;

15 N-épsilon31-[2-(2-(2-(2-(2-(S)-4-carboxi-4-((trans-4-[(19-carboxionadecanoilamino)metil]ciclohexanocarbonil)amino)butirilamino]etoxi)etoxi)acetilamino]etoxi)etoxi)acetil]-[Aib8, Glu22, Val25, Arg26, Lys31]GLP-1-(7-33)amida;



20

[Desamino His7,Glu22,Arg26]-GLP-1 (7-34);



;

prevención de hiperglucemia, diabetes tipo 2, intolerancia a la glucosa, diabetes tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, aterosclerosis, infarto de miocardio, coronariopatía y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebrovascular, síndrome de intestino irritable, dispepsia y úlceras gástricas.