

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 980 707**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/605** (2006.01)

**A61K 38/26** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2019** **E 22177403 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.04.2024** **EP 4122954**

54 Título: **Nuevos análogos de GLP-1**

30 Prioridad:

**05.04.2018 IN 201821013109**

**26.10.2018 IN 201821040468**

**26.10.2018 IN 201821040474**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.10.2024**

73 Titular/es:

**SUN PHARMACEUTICAL INDUSTRIES LIMITED**  
**(100.0%)**

**Sun House, Plot No. 201 B/1, Western Express**  
**Highway, Goregaon (E)**  
**Mumbai, Maharashtra 400 063, IN**

72 Inventor/es:

**THENNATI, RAJAMANNAR;**  
**CHATURVEDI, NISHITH;**  
**BURADE, VINOD SAMPATRAO;**  
**SHAH, PRADEEP DINESH;**  
**NATARAJAN, MUTHUKUMARAN;**  
**NAGARAJA, RAVISHANKARA MADAVATI;**  
**ZALAWADIA, RISHIT MANSUKHLAL;**  
**PANDYA, KUNAL;**  
**PATEL, BRIJESHKUMAR;**  
**JOSHI, DHIREN RAMESHCHANDRA;**  
**SONI, KRUNAL HARISHBHAI;**  
**TIWARI, ABHISHEK y**  
**PATEL, VIPULKUMAR SHANKARBHAI**

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

### Observaciones:

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

ES 2 980 707 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Nuevos análogos de GLP-1

**SOLICITUDES RELACIONADAS**

- 5 Esta solicitud reivindica el beneficio de tres aplicaciones provisionales indias que tienen números de solicitud IN 201821013109 (presentada el 05 de abril de 2018); IN 201821040468 (presentada el 26 de octubre de 2018) e IN 201821040474 (presentada el 26 de octubre de 2018), que se incorporan a la presente por referencia.

**CAMPO DE LA DESCRIPCIÓN**

- 10 La presente descripción se refiere a nuevos análogos del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) (7-38) que tienen una secuencia de aminoácidos con Leu o Ile en el C-terminal. Los nuevos análogos son agonistas de GLP-1 potentes con efecto adverso reducido y duración de la acción mejorada. La presente descripción se refiere además a derivados acilados de los nuevos análogos, que han mejorado aún más la potencia y duración de la acción mejoradas y son adecuados para la administración oral. Los análogos descritos en la presente descripción están acilados con restos prolongados, que aumentan la duración de la actividad de los compuestos. Los análogos descritos en la presente descripción pueden ser útiles en el tratamiento de la diabetes y la obesidad.

**15 ANTECEDENTES DE LA DESCRIPCIÓN**

- El péptido-1 similar al glucagón (GLP-1) es una hormona que se produce principalmente en las células L enteroendocrinas del intestino y se secreta en el torrente sanguíneo cuando los alimentos que contienen grasa, proteína hidrolizada y/o glucosa entran en el duodeno. El GLP-1 se deriva del procesamiento postraducciona
- 20 específico de la célula del gen del preproglucagón. Inicialmente, el péptido GLP-1 (1-37) se identificó a partir de este procesamiento, pero fueron los dos productos truncados en N-terminal, GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 1) y GLP-1 (7-36) amida, los que se encontraron para reconocer el receptor pancreático y que se determinaron como la especie activa *in vivo*. Se ha descubierto que GLP-1 estimula la secreción de insulina, lo que provoca de esta manera la captación de glucosa por las células y la disminución de los niveles de glucosa sérica. Los agonistas de GLP-1 están disponibles para el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) como fármacos favorecidos, ya que carecen de hipoglucemia
- 25 y tienen un beneficio positivo de la pérdida de peso. La sustancia endógena, GLP-1(7-37) y GLP-1(7-36)amida, se escinden por peptidasas y, por lo tanto, tienen una semivida muy corta. Se hicieron esfuerzos para mejorar el rendimiento mediante el desarrollo de análogos de GLP-1 con una semivida mejorada. El primer fármaco aprobado en 2005 fue exenatida con dosificación dos veces al día a un nivel de dosis de 10 µg y se encontró que mostraba una mejora significativa en la HbA1c, un marcador del control de glucosa. Además, Novo Nordisk desarrolló liraglutida (patente de los Estados Unidos núm. 6,268,343) (SEQ ID NO: 2) con una dosificación diaria de 1,8 mg, s.c./día y aprobada en 2010. La investigación y desarrollo adicionales produjeron una vez a la semana productos como albiglutida desarrollado por GSK y dulaglutida desarrollado por Eli Lilly. Recientemente, semaglutida (publicación internacional núm. WO 2006/097537 A2), un análogo de GLP-1 fue aprobado por la USFDA. La semaglutida (SEQ ID NO: 3) se comercializa bajo el nombre comercial Ozempic®. Se administra como una inyección subcutánea semanal.
- 35 En la literatura se informan muchos intentos de producir análogos de GLP-1 que tienen una potencia y duración de la acción mejoradas. La patente de los Estados Unidos núm. 7,291,594 B2 (la patente US '594) describe derivados de GLP-1 (7-35) que han añadido varios residuos de arginina y/o lisina al extremo C terminal de este para proporcionar una alta biodisponibilidad a través de membranas mucosas. La patente US '594 describe además que este derivado puede conferirse con resistencia a la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) mediante sustitución del aminoácido 8 en su
- 40 secuencia de aminoácidos de GLP-1 con Ser, o con resistencia a la tripsina mediante sustitución de los aminoácidos 26 y 34 con Gin y Asn, respectivamente. La patente de los Estados Unidos núm. 7,893,017 B2 (la patente US '017) describe un análogo de GLP-1 acilado en donde el análogo de GLP-1 se estabiliza contra DPP-IV mediante la modificación de al menos un residuo de aminoácido en las posiciones 7 y 8 con relación a la secuencia GLP-1 (7-37) y en donde dicha acilación es un diácido unido directamente al residuo de aminoácido C-terminal de dicho análogo de GLP-1.
- 45 La patente de los Estados Unidos núm. 8,951,959 B2 (la patente US '959) describe un análogo de GLP-1 (7-37) resistente a DPP-IV que tiene un residuo de aminoácido no proteínogénico que contiene el grupo trifluorometilo en la posición 8 con relación a la secuencia GLP-1 y está acilado con un resto que comprende dos grupos ácidos al residuo de lisina en la posición 26.
- 50 La patente de los Estados Unidos núm. 7,084,243 B2 (la patente US '243) describe análogos de GLP-1 (7-37) que

tienen Val o Gly en la posición 8 con relación a la secuencia GLP-1 (7-37) como péptidos resistentes a DPP-IV.

La publicación internacional núm. WO 2017/149070 A1 (el documento WO '070) describe análogos de GLP-1 que tienen un Trp en una posición que corresponde a la posición 8 de GLP-1 (7-37) y estos compuestos con Trp8 demostraron ser muy estables contra la degradación por DPP-IV.

- 5 La publicación internacional núm. WO 2004/103390A2 (el documento WO '390) describe que la modificación en la posición P<sub>1</sub> (que corresponde a la posición 9 en el caso de GLP-1 (7-37)) puede producir análogos de GLP-1 con una susceptibilidad muy reducida a la escisión mediada por enzimas (tal como DPP-IV) con relación al sustrato natural, pero mantiene la actividad biológica del sustrato natural. El documento WO '390 describe además análogos de GLP-1 (7-37) que tienen un aminoácido con carbono C $\beta$  tetrasustituido (tal como *terc*- leucina) en la posición 9 proporciona

10 análogos de GLP con resistencia a la degradación por DPP-IV.  
El documento de publicación internacional núm. WO 2015/086686 A2 (la publicación WO '686) describe que la incorporación de aminoácidos funcionalizados con alfa-metilo directamente en la cadena principal de los análogos de GLP-1 se ha determinado que produce péptidos resistentes a proteasa (incluye resistente a DPP-IV).

15 Otros diversos agonistas de GLP-1 resistentes a DPP-IV se describen en las publicaciones de patentes tales como las publicaciones de patentes núms. WO 2007/030519 A2, WO 2004/078777 A2, WO 2007/039140 A1, WO 2014/209886 A1, WO 2012/016419 A1, WO 2017/211922 A2, WO 2016/198544 A1 y WO 2013/051938 A2.

Diversas solicitudes de patentes describen análogos de GLP-1 extendidos en el C terminal con estabilidad aumentada y mayor duración de la acción. Por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos núms. 7,482,321 B2, 9,498,534 B2 y 7,897,566 B2.

20 Diversas solicitudes de patentes describen análogos de GLP-1 acilados en donde los análogos de GLP-1 se unen al sustituyente lipofílico opcionalmente a través de un enlazador para proporcionar una mayor duración de la acción.

La patente de los Estados Unidos núm. 8,603,972 B2 (el documento US '972) describe derivados monoacilados de análogos de GLP-1 en donde el residuo de Lys en la posición 37 o 38 del análogo de GLP-1 está acilado.

25 Las patentes de los Estados Unidos núms. 8,648,041 B2, 9,758,560 B2, 9,006,178 B2, 9,266,940 B2, 9,708,383 B2 y los documentos de publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núms. US 2015/0152157 A1, US 2015/0133374 A1 describen derivados diacilados de análogos de GLP-1.

La publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos No. US 2016/0200791 A1 describe derivados triacilados de análogos de GLP-1.

30 Los documentos de publicación internacional núms WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 y WO 2014/202727 A1 describen análogos de GLP-1 acilados en donde el residuo de Lys de análogos de GLP-1 se une a dos restos prolongados a través de un enlazador ramificado.

Los documentos de publicación internacional núms. WO 2009/030771 A1 y WO 2018/083335 A1 describen diversos agentes de acilación (cadena lateral) que pueden unirse al residuo de Lys de análogos de GLP-1 para proporcionar una mayor duración de la acción.

35 La publicación internacional núm. WO 2013/186240 A2 describe análogos del péptido de exendina-4 que tienen Gly, Ser o Ser funcionalizado, por ejemplo, Ser (OCH<sub>3</sub>), D-Ser o D-Ser funcionalizado, por ejemplo, D-Ser (OCH<sub>3</sub>), Aib, Ala o D-Ala en la posición 2 de la secuencia de aminoácidos de exendina-4.

40 Otros diversos análogos de GLP-1 se describen en solicitudes de patentes tales como los documentos de publicación internacional núms. WO 2005/027978 A2, WO 1998/008871 A1, WO 1999/043705 A1, WO 1999/043706 A1, WO 1999/043707 A1, WO 1999/043708 A1, WO 2000/034331 A2, WO 2009/030771 A1, WO 2011/080103 A1, WO 2012/140117 A1, WO 2012/062803 A1, WO 2012/062804 A1, WO 2013/037690 A1, WO 2014/202727 A1, WO 2015/000942 A1, WO 2015/022400 A1, WO 2016/083499 A1, WO 2016/097108 A1 y WO 2017/149070 A1.

Aún así, existe la necesidad de desarrollar análogos de GLP-1 que tengan propiedades óptimas deseadas en términos de estabilidad y duración de la acción.

## 45 RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

Un aspecto de la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-X33-X34

en donde X2 es Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala o Aib;

50 X3 está ausente o Gin;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

X33 es Leu, D-Leu, D-Ile o Ile;

X34 está ausente y

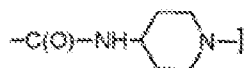
X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

5 {-Q-T-U-W-Y-Z

en donde Q y T están ausentes;

U está ausente o  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W está ausente o seleccionado de un grupo que consiste de  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$ ,  $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$ ,  $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$  y



10

en donde ] es el punto de unión con el grupo Y;

Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$ , en donde - es el punto de unión con el grupo Z;

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  o  $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$  en donde n es un número entero de 14 a 20.

15 Los polipéptidos de la presente descripción son agonistas de GLP-1 potentes con menos efectos adversos. Además, los polipéptidos de la presente descripción son estables y tienen una larga duración de la acción y son adecuados para la administración oral.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1A ilustra la preparación del resto A-OSu (intermediario 3). La figura 1B ilustra la preparación del resto A-OSu (intermediario 3).

20 La figura 2 ilustra la preparación del resto C-OSu.

La figura 3 ilustra la preparación del resto D-OSu.

La figura 4 ilustra la preparación del resto E-OSu.

La figura 5 ilustra la preparación del resto F-OSu.

25 Las figuras 6A y 6B ilustran los resultados de una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) para el Compuesto 1 en ratas; inyección única; 1 mg/kg de glucosa ABC 0-120 min (figura 6A=después de 22 horas, figura 6B=después de 46 horas).

La figura 7 ilustra la reducción de los niveles de glucemia en ratones diabéticos tipo 2 db/db después del tratamiento crónico con el Compuesto 1.

30 La figura 8 ilustra la reducción en la ingestión de alimentos en ratones db/db después del tratamiento con el Compuesto 1.

La figura 9 ilustra la eficacia del Compuesto 1 en ratones db/db en la reducción del peso corporal.

La figura 10 ilustra la reducción de Hb1Ac en ratones db/db después del tratamiento con el Compuesto 1.

## ABREVIATURAS

35 Aib: Ácido 2-aminoisobutírico  
ADO: Ácido 8-amino-3,6-dioxo-octanoico  
OGTT: Prueba de tolerancia a la glucosa oral  
DIPEA: *N,N'*-diisopropiletilamina  
HOBt: 1-hidroxibenzotriazol  
DIPC: *N,N'*-di-isopropilcarbodiimida  
40 HOSu: A-hidroxisuccinimida  
IBCF: Isobutilcloroformiato  
NMM: N-metilmorfolina  
THF: Tetrahidrofurano  
DCM: Diclorometano  
45 DMAP: 4-dimetilaminopiridina  
DCC: Diciclohexil carbodiimida  
DMAc: Dimetilacetamida

**DESCRIPCIÓN DE LA DIVULGACIÓN**

La presente descripción proporciona un análogo de GLP-1 estable de acción prolongada, que no requiere una dosificación subcutánea frecuente y también es adecuado para la administración oral. Se encontró sorprendentemente que la adición de una Leu adicional en el C terminal de la secuencia produjo péptidos con una potencia y duración de la acción significativamente mejoradas en comparación con el péptido original. Los péptidos con una Ile adicional también mostraron un efecto similar de potencia y duración de la acción mejoradas en comparación con el péptido original. Adicionalmente, la descripción en la presente descripción demuestra restos, que pueden añadirse a péptidos que son análogos de GLP-1 (7-37) a través de reacción de acilación para producir compuestos con una potencia significativamente mejorada y una mayor duración de la acción. Los restos prolongados de los compuestos descritos tienen enlaces más estables, que son menos susceptibles a la escisión por enzimas biológicas. Por lo tanto, los compuestos descritos en la presente descripción son más estables y requieren una administración menos frecuente que aumenta el cumplimiento del paciente. En consecuencia, en algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-

X33-X34 (SEQ ID NO: 4)

en donde X2 es Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala o Aib;

X3 está ausente o Gln;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

X33 es Leu, D-Leu, D-Ile o Ile;

X34 está ausente y

X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado.

En algunas modalidades, X21 puede acilarse con los restos prolongados informados en las patentes de los Estados Unidos núms. 6,268,343, 8,951,959 B2, 8,603,972 B2, 8,648,041 B2, 9,758,560 B2, 9,006,178 B2, 9,266,940 B2, 9,708,383 B2 y la publicación de solicitud de patente de los Estados Unidos núms. US 2015/0152157 A1 y US 2015/0133374 A1; los documentos de publicación internacional núms. WO 2009/030771 A1, WO 2006/097537 A2 y WO 2018/083335 A1.

En algunas modalidades, la Lys de X21 está acilada en su grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral con un resto que comprende un grupo de ácido graso. El grupo de ácido graso puede unirse a la Lys de X21 a través un enlazador. En consecuencia, en algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-

X33-X34

en donde X2 es Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala o Aib;

X3 está ausente o Gln;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

X33 es Leu, D-Leu, D-Ile o Ile;

X34 está ausente y

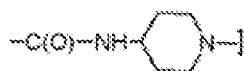
X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T—U-W-Y-Z

en donde Q y T están ausentes;

U está ausente o -C(O)-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-} en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W está ausente o seleccionado de un grupo que consiste de -C(O)-CH<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-, -C(O)-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>3-4</sub>-NH-, -C(O)-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-NH- y



en donde ] es el punto de unión con el grupo Y; Y es  $\text{-C(O)-(CH}_2\text{)}_2\text{-CH(COOH)NH--}$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z;

Z es  $\text{-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-COOH}$  o  $\text{-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$  en donde n es un número entero de 14 a 20.

5 En algunas modalidades, el aminoácido en X2 se selecciona de Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe), Ala o Aib.

En algunas modalidades X2 es Aib.

En algunas modalidades, X3 está ausente.

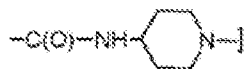
En algunas modalidades, X33 es Leu.

En algunas modalidades, X33 es Ile.

10 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

en donde W se selecciona de un grupo que consiste de  $\text{-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_{3-4}\text{-NH-}$ ,  $\text{-C(O)-C(CH}_3\text{)}_2\text{-NH-}$  y



15 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\epsilon$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

en donde U y W están ausentes y Z es  $\text{-C(O)-(CH}_2\text{)}_n\text{-CH}_3$  en donde n es el número entero 14.

20 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es  $\text{-C(O)-CH}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-(CH}_2\text{)}_2\text{-NH-}$ .

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

25 {-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es  $\text{-C(O)-C(CH}_3\text{)}_2\text{-NH-}$ .

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

30 en donde W es  $\text{-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_4\text{-NH-}$ .

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

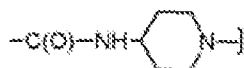
{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es  $\text{-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-NH-}$ .

35 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es



En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  en donde n es el número entero 16.

- 5 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z ,

en donde Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$  en donde n es un número entero 14.

En algunas modalidades,

- 10 X2 es Ala o Aib;  
X3 está ausente;  
X33 es Leu;  
U está ausente;  
W está ausente;

- 15 Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH--$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z;  
Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$  en donde n es el número entero 14.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-

- 20 X33-X34

en donde X2 es Aib;

X3 está ausente;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

- 25 X24 es Ile;

X33 es Leu;

X34 está ausente y

X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

- 30 en donde Q y T están ausentes;

U es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-}$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-]$ , en donde ] es el punto de unión del grupo Y;

Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH--$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z;

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  en donde n es el número entero 16.

- 35 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-

X33-X34

en donde X2 es Aib;

- 40 X3 está ausente;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

X33 es Leu;

X34 está ausente y

X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

en donde Q y T están ausentes;

5 U es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH\}$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W es  $-C(O)-C(CH_3)_2-NH\}$  en donde } es el punto de unión con el grupo Y;

Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH\}$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z;

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  en donde n es el número entero 16.

10 En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-  
X33-X34

en donde X2 es Aib;

X3 está ausente;

15 X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

X33 es Leu;

X34 está ausente y

20 X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

en donde Q y T están ausentes;

U es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH\}$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W es  $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH\}$  en donde } es el punto de unión con el grupo Y;

25 Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH\}$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z;

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  en donde n es el número entero 16.

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

30 en donde W es  $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH\}$ .

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es  $-C(O)-NH-(CH_2)_3-NH\}$ .

35 En algunas modalidades, la descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-  
X33-X34

en donde X2 es Aib;

X3 está ausente;

40 X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

X33 es Leu;



X34 está ausente y

X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

en donde Q y T están ausentes;

5 U es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W es  $-C(O)-NH-(CH_2)_4-NH-$ , en donde ] es el punto de unión del grupo Y;

Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z;

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  o  $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$  en donde n es un número entero de 14 a 20.

10 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  en donde n es el número entero 16.

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

15 {-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$  en donde n es el número entero 14.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-

20 X33-X34

en donde X2 es Aib;

X3 está ausente;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

25 X24 es Ile;

X33 es Leu;

X34 está ausente y

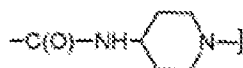
X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

30 en donde Q y T están ausentes;

U es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W es



en donde ] es el punto de unión con el grupo Y;

35 Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z; y

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  en donde n es el número entero 16.

En algunas modalidades, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

H-X2-X3-X4-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-X16-G-Q-A-A-X21-E-F-X24-A-W-L-V-R-G-R-G-

40 X33-X34

en donde X2 es Ser, Ser(OMe), D-Ser, D-Ser(OMe);

X3 está ausente;

X4 es Glu;

X16 es Glu;

X24 es Ile;

5 X33 es Leu;

X34 está ausente y

X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\epsilon$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z

en donde Q y T están ausentes;

10 U es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$  en donde } es el punto de unión con el grupo W;

W es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$ ,  $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$ ,  $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$ , en donde ] es el punto de unión con el grupo Y;

Y es  $-C(O)-(CH_2)_2-CH(COOH)NH-$ , en donde -- es el punto de unión con el grupo Z; y

Z es  $-C(O)-(CH_2)_n-COOH$  o  $-C(O)-(CH_2)_n-CH_3$  en donde n es un número entero de 14 a 20.

15 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\Sigma$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es  $-C(O)-NH-(CH_2)_{3-4}-NH-$ .

20 En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\epsilon$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

{-Q-T-U-W-Y-Z,

en donde W es  $-C(O)-CH_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-NH-$ ;

En algunas modalidades, X21 es Lys en donde el grupo amino ( $\epsilon$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto:

25 {-Q-T-U-W-Y-Z,

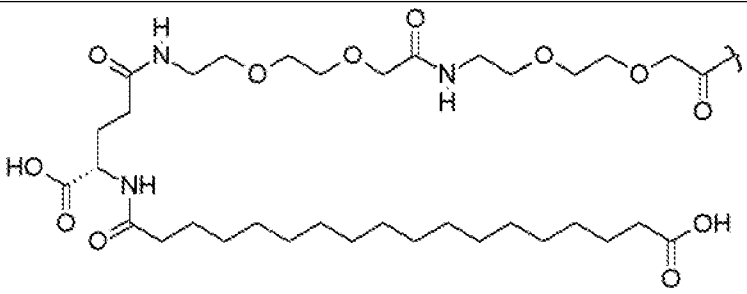
en donde W es  $-C(O)-C(CH_3)_2-NH-$

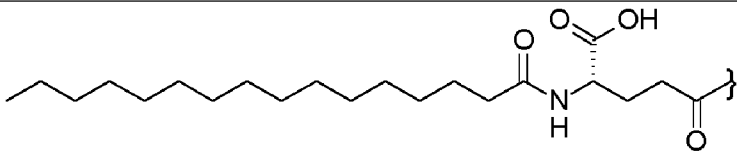
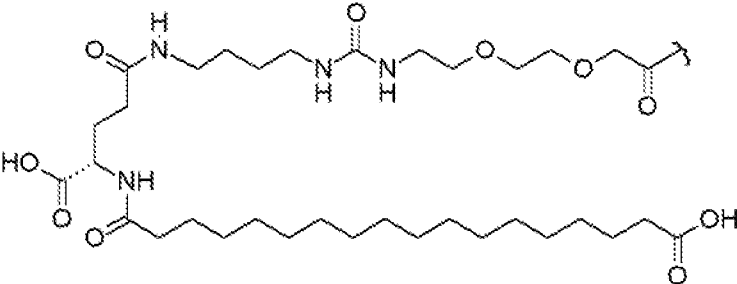
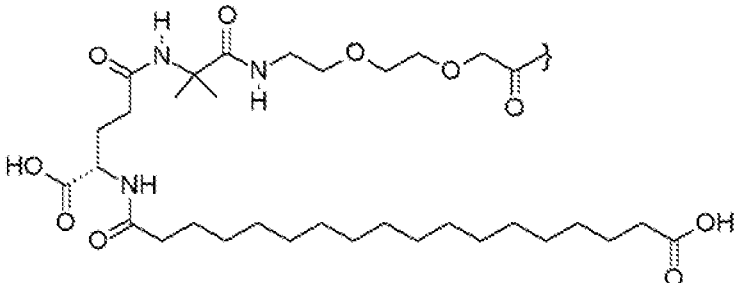
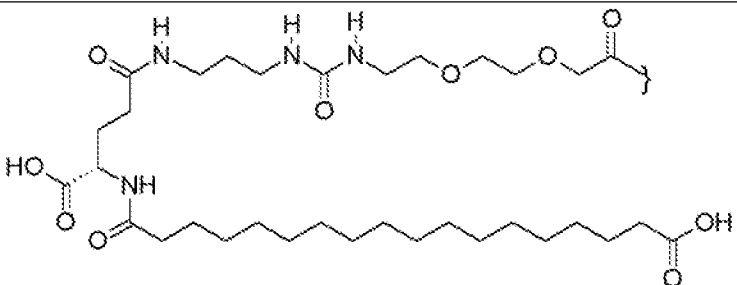
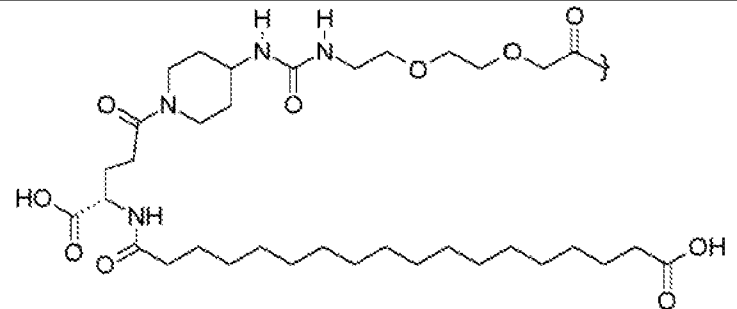
En algunas modalidades, X21 es Lys modificado con lípidos en donde el grupo amino ( $\epsilon$  amino) de cadena lateral de Lys está acilado con un resto

{-Q-T-U-W-Y-Z

30 que se representa por los restos proporcionados en la tabla 1

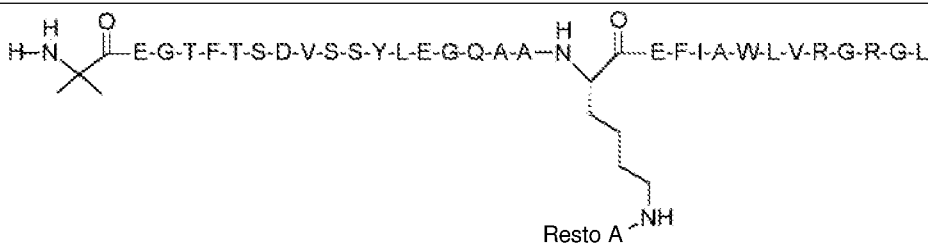
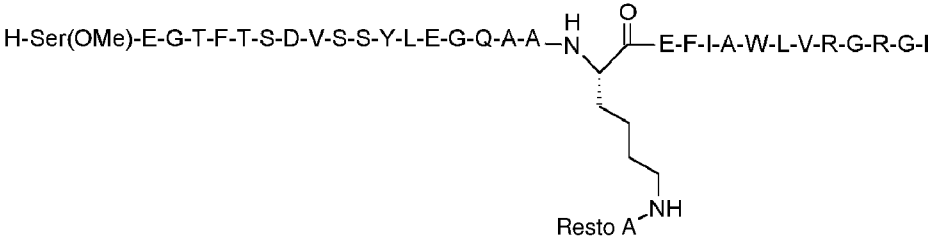
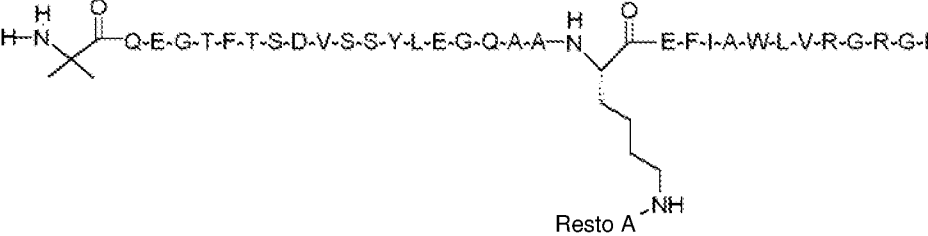
**Tabla 1: Restos representativos para el grupo {-Q-T-U-W-Y-Z**

Designación	Resto
Resto A	

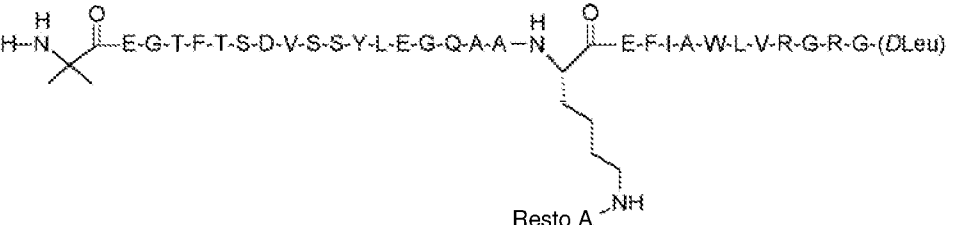
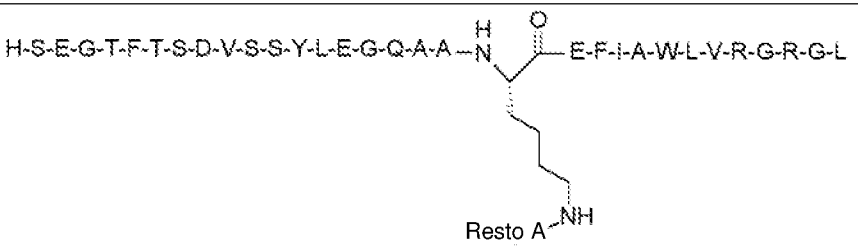
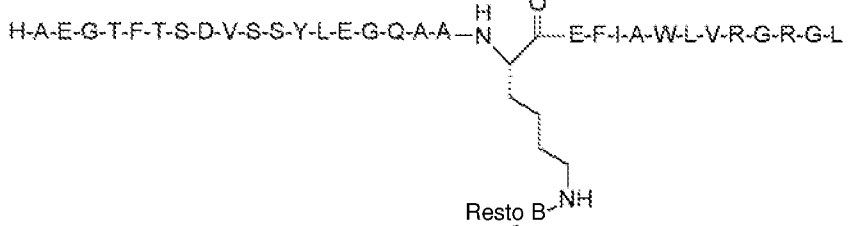
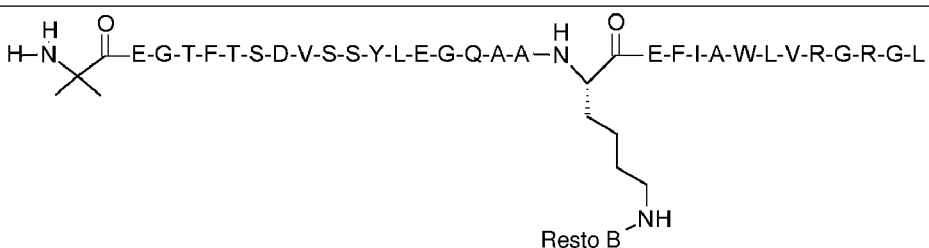
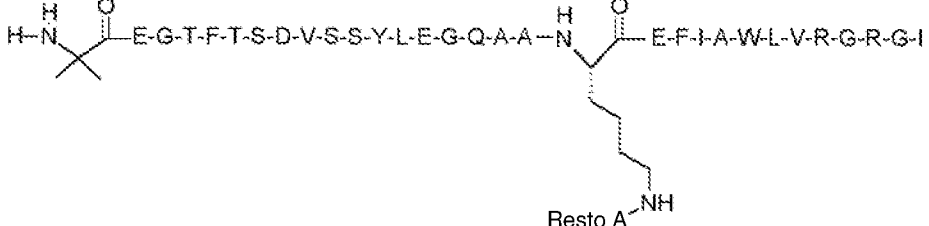
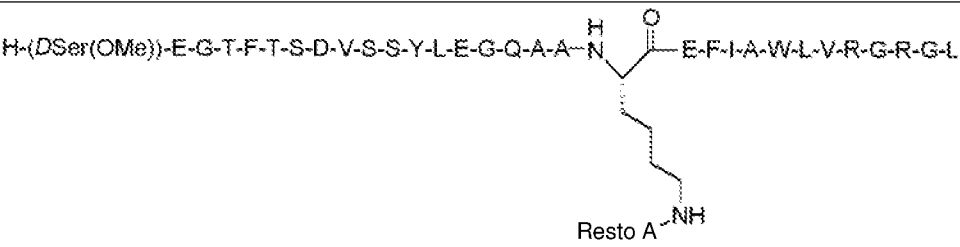
Resto B	
Resto C	
Resto D	
Resto E	
Resto F	

En otra modalidad, la presente descripción proporciona un polipéptido de acuerdo con una cualquiera de las modalidades anteriores, que se selecciona de los péptidos proporcionados en la tabla 2:


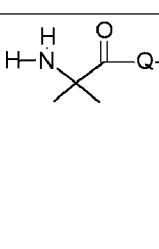
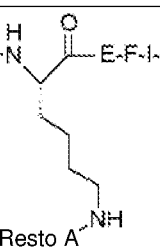
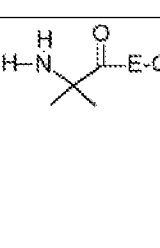

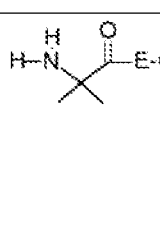
Tabla 2: Compuestos de polipéptidos representativos de la presente descripción

Comp. #	Estructura*	Seq ID
1	 <p>Resto A-NH</p>	SEQ ID NO: 05
2	 <p>Resto A-NH</p>	SEQ ID NO: 06
3	 <p>Resto A-NH</p>	SEQ ID NO: 07

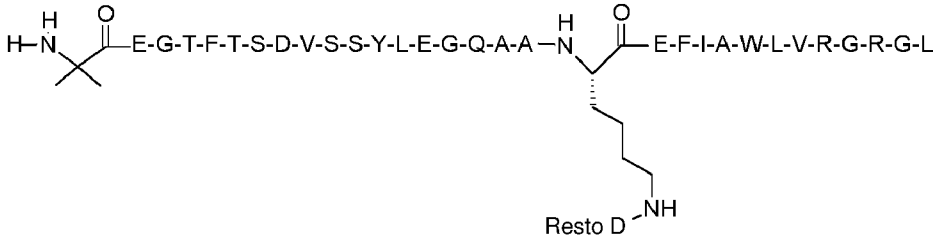
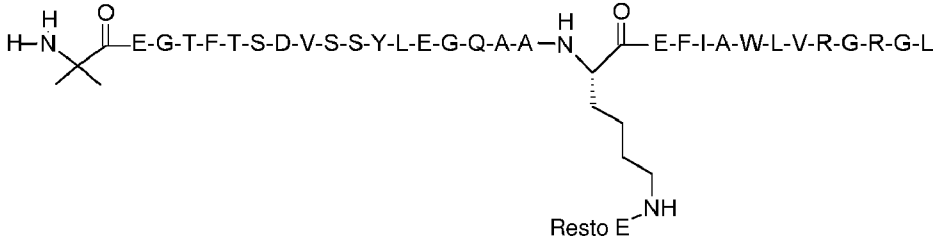
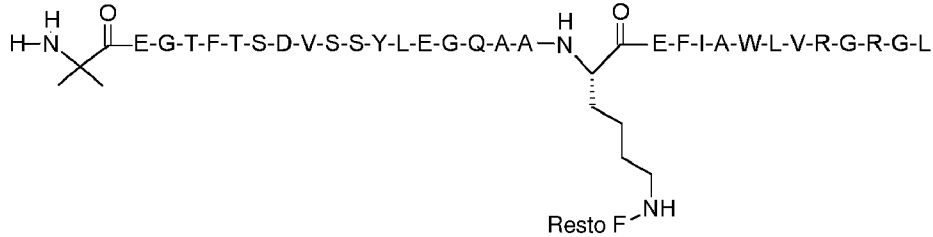
(continuación)

Comp. #	Estructura*	Seq ID
4	 <p>Resto A</p>	SEQ ID NO: 08
5	 <p>Resto A</p>	SEQ ID NO: 09
6	 <p>Resto B</p>	SEQ ID NO: 10
7	 <p>Resto B</p>	SEQ ID NO: 05
8	 <p>Resto A</p>	SEQ ID NO: 11
9	 <p>Resto A</p>	SEQ ID NO: 12

(continuación)

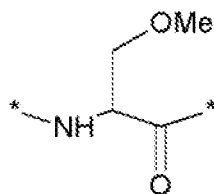
Comp. #	Estructura*	Seq ID
10	$\text{H-(D Ser)-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto A} \end{array} \text{E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L}$ 	SEQ ID NO: 13
11	$\text{H-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto A} \end{array} \text{Q-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto A} \end{array} \text{E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-(DLeu)}$ 	SEQ ID NO: 14
12	$\text{H-A-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto A} \end{array} \text{E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L}$ 	SEQ ID NO: 10
13	$\text{H-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto C} \end{array} \text{E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto C} \end{array} \text{E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L}$ 	SEQ ID NO: 05
14	$\text{H-S-E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto C} \end{array} \text{E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L}$ 	SEQ ID NO: 09
15	$\text{H-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto C} \end{array} \text{E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N} \begin{array}{c} \text{H} \\   \\ \text{---} \text{C} \text{---} \text{O} \\   \\ \text{Resto C} \end{array} \text{E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-I}$ 	SEQ ID NO: 11

(continuación)

Comp. #	Estructura*	Seq ID
16	 Resto D-NH	SEQ ID NO: 05
17	 Resto E-NH	SEQ ID NO: 05
18	 Resto F-NH	SEQ ID NO: 05
<p>* A menos que se indique de cualquier otra manera, todos los aminoácidos en las estructuras tienen una configuración L en una posición. <i>D</i> cuando se usa como prefijo al aminoácido en la secuencia denota la configuración D del aminoácido. Por ejemplo (<i>DSer</i>) denota que el aminoácido serina en la secuencia tiene configuración D.</p>		

A menos que se indique de cualquier otra manera, la descripción pretende cubrir tanto los isómeros L como D de los aminoácidos en las secuencias.

Ser(OMe) como se describió en la presente descripción es aminoácido serina con su grupo hidroxilo metilado y tiene la siguiente estructura.



5

Las secuencias de polipéptidos mencionadas en la descripción se representan por el código de una sola letra de los aminoácidos según lo aprobado por IUPAC.

Q, T, U, W, Y y Z como se usa en la presente descripción para definir el resto de acilación de las modalidades de la presente descripción son diferentes del código de una sola letra del aminoácido usado para denotar la secuencia de polipéptidos.

10

Los polipéptidos de la presente descripción mostraron sorprendentemente una reducción significativa en la glucemia cuando se sometieron a una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en ratas SD. El porcentaje de reducción de la glucemia en ratas SD cuando se enfrentaba a la glucosa oral fue significativamente menor que los polipéptidos correspondientes que carecían de Leu o Ile adicional en la posición X33.

15

La presente invención se ilustra además en detalle con referencia a los siguientes ejemplos. Se desea que el ejemplo se considere en todo respecto como ilustrativo y no pretende limitar el alcance de la invención reivindicada.

**EJEMPLOS:****Métodos generales de preparación:**

El compuesto del polipéptido de la presente descripción puede prepararse mediante los métodos descritos en la presente descripción más abajo. El proceso implica dos etapas, que implican la preparación del péptido lineal original y la subsecuente unión de la cadena de ácido graso al péptido original.

Los péptidos descritos en la presente descripción pueden prepararse por síntesis química mediante el uso de técnicas de fase sólida tales como las descritas en G. Barany y R. B. Merrifield, "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology"; Volume 2-"Special Methods in Peptide Synthesis, Part A", pp. 3-284, E. Gross and J. Meienhofer, Eds., Academic Press, New York, 1980; and in J. M. Stewart and J. D. Young, "Solid-Phase Peptide Synthesis", 2nd Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984. La estrategia deseada se basa en el grupo Fmoc (9-fluorenilmetiloxycarbonil) para la protección temporal del grupo  $\alpha$ -amino, en combinación con grupos protectores tales como grupos terc-butilo (-tBu), *terc*-butiloxycarbonil (-Boc), tritilo (-Trt) para la protección temporal de las cadenas laterales de aminoácidos (véase, por ejemplo, E. Atherton y R. C. Sheppard, "The Fluorenylmethoxycarbonyl Amino Protecting Group", en "The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology"; Volumen 9-"Special Methods in Peptide Synthesis, Part C", pp. 1-38, S. Undenfriend y J. Meienhofer, Eds., Academic Press, San Diego, 1987).

Los péptidos pueden sintetizarse de manera escalonada en un soporte de polímero insoluble (también denominado "resina") que comienza a partir del extremo C terminal del péptido. Una síntesis se comienza al añadir el aminoácido C-terminal del péptido a la resina a través de la formación de un enlace de amida o éster. Esto permite la liberación final del péptido resultante como una amida o ácido carboxílico C-terminal, respectivamente.

Se requiere que el aminoácido C-terminal y todos los demás aminoácidos usados en la síntesis tengan sus grupos  $\alpha$ -amino y funcionalidades de la cadena lateral (si están presentes) protegidas diferencialmente de manera que el grupo protector  $\alpha$ -amino pueda eliminarse selectivamente durante la síntesis. El acoplamiento de un aminoácido se realiza mediante la activación de su grupo carboxilo como un éster activo y la reacción de este con el grupo  $\alpha$ -amino desbloqueado del aminoácido *N*-terminal añadido a la resina. La secuencia de desprotección y acoplamiento del grupo  $\alpha$ -amino se repite hasta que toda la secuencia del péptido se ensamble. El péptido se libera luego de la resina con desprotección concomitante de las funcionalidades de la cadena lateral, usualmente en presencia de depuradores apropiados para limitar las reacciones laterales. El péptido resultante se purifica finalmente por HPLC de fase inversa. El péptido original puede entonces acoplarse a la cadena de ácidos grasos al acoplar la cadena de ácidos grasos activados con el péptido original. La cadena de ácidos grasos puede producirse mediante métodos bien conocidos en química orgánica. Por ejemplo, la cadena de ácidos grasos puede fabricarse mediante el uso de métodos sintéticos de fase sólida que permiten la preparación de cadenas de ácidos grasos lineales.

Los péptidos lineales sintetizados se purificaron mediante un procedimiento de HPLC preparativa como se describe más abajo:

HPLC preparativa: Módulo de gradiente cuaternario WATERS 2555 (flujo total máximo: 300 ml/min, presión máxima: 3000 psi) o

Shimadzu LC-8A (flujo total máximo: 150 ml: presión máxima: 20 Mpa)

Columna: C18, 10 $\mu$

Flujo: 75 ml/min

Fase móvil:

Para la primera purificación

Fase móvil A: tampón fosfato pH 7,5

Fase móvil B: Acetonitrilo

Gradiente: 10 a 40 % de fase móvil B en 300 min.

Para la segunda purificación:

Fase móvil A: Ácido acético al 1 % en agua

Fase móvil B: Ácido acético al 1 % en acetonitrilo:n-propanol(50:50)

Gradiente: 15 a 45 % de fase móvil B en 300 min

Los compuestos finales de la presente descripción se purificaron mediante un procedimiento de HPLC preparativa como se describe más abajo: HPLC preparativa: Módulo de gradiente cuaternario WATERS 2555 (flujo total máximo:



## ES 2 980 707 T3

300 ml/min, presión máxima: 3000 psi) o Shimadzu LC-8A (flujo total máximo: 150 ml, presión máxima: 20 Mpa)

Columna: C18, 10 $\mu$

Flujo: 75 ml/min

Fase móvil:

	Para la primera purificación	Para la segunda purificación
Fase móvil A	Tampón fosfato pH 7,5	Ácido acético al 1 % en agua
Fase móvil B	Acetonitrilo	Ácido acético al 1 % en acetonitrilo:n-propanol (50:50)
Gradiente	Fase móvil B del 10 al 40 % en 300 min	Fase móvil B del 15 al 45 % en 300 min

- 5 La pureza de los compuestos de la presente descripción se analizó mediante el método RP-HPLC como se describe más abajo:

### Método de HPLC B1:

Columna: YMC Pack-Ph (4,6 mm X 150 mm 3 $\mu$ )

- 10 Eluyente: Fase móvil A: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en agua

Fase móvil B: Ácido trifluoroacético al 0,1 % en acetonitrilo

Régimen de flujo: 1,5 ml/min

Detección: Detección de UV a 210 nm

Temperatura de la columna: 50 °C

- 15 Tiempo de corrida: 50 min.

Gradiente:

Tiempo	% de fase móvil A	% de fase móvil B
0,01	90	10
35,0	20	80
40,0	20	80
41,0	90	10
50,0	90	10

### Método de HPLC B2:

Columna: YMC-Pack Pro C18 (4 mm x 250 mm, 3 $\mu$ )

- 20 Eluyente: Fase móvil A: Tampón: Acetonitrilo (900:100)

Fase móvil B: Tampón: Acetonitrilo (300:700)

Tampón: Dihidrógeno ortofosfato de potasio en agua, pH ajustado a 3,0 $\pm$ 0,1 con ácido ortofosfórico Velocidad de flujo: 1,0 mL/min

Detección: Detección de UV a 210 nm

- 25 Temperatura de la columna: 50 °C

Temperatura de la bandeja de muestras: 8 °C

Tiempo de corrida: 38 min.

Tiempo	% de fase móvil A	% de fase móvil B
0	100	0
5	100	0
30	0	100

32	0	100
32,1	100	0
38	100	0

**Método de HPLC B3:**

Columna: Waters X-Select CSH-C18 (150 mm × 4,6 mm; 2,5 μ)

Eluyente: Fase móvil A: Tampón: Acetonitrilo (900:100)

5 Fase móvil B: Tampón: Acetonitrilo (300:700)

Tampón: Dihidrógeno ortofosfato de potasio en agua, pH ajustado a 1,5±0,1 con ácido ortofosfórico Velocidad de flujo: 0,9 mL/min

Detección: Detección de UV a 210 nm

Temperatura de la columna: 40 °C

10 Temperatura de la bandeja de muestras: 5 °C

Tiempo de corrida: 100 min.

Tiempo	Fase móvil A	Fase móvil B
0	50	50
40	43	57
55	43	57
90	0	100
91	50	50
100	50	50

Los compuestos de la presente descripción se analizaron por la LCMS como se describe más abajo:

Los espectros de masas se registraron en LCMS mediante el uso Waters Acquity® QDa®, Waters Micromass Quattro Micro API o Thermo scientific LCQ FleetTM. La solución de prueba se preparó al disolver una cantidad adecuada de analito en el diluyente con una concentración final de 1 μg/ml a 50 μg/ml en dependencia de la ionización del analito. La solución de prueba se infundió a una velocidad de aproximadamente 10 μl a 50 μl por minuto en LCMS durante 1 min y los espectros de masas se registraron en el modo positivo o negativo de ionización por electropulverización (ESI) y en un intervalo de masas apropiado.

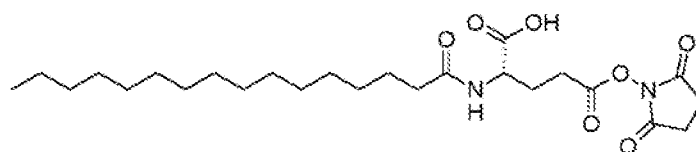
**Ejemplo 1: Preparación de cadenas laterales de ácidos grasos activados:**

20 **1. Preparación de ácido 18-[[[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etil-amino]-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-4-oxobutil]amino]-18-oxo-octadecanoico (resto A-OSu, intermediario-3)**

La cadena lateral de ácidos grasos activados, resto A-OSu se preparó por síntesis en fase sólida mediante el uso de resina de cloruro de 2-clorotritilo como se representa esquemáticamente en la figura 1A. El ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético (Intermediario- 1) se unió a la resina de cloruro de 2-clorotritilo en presencia de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) que produjo ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El intermediario 1 puede prepararse mediante el acoplamiento ácido 2-[2-(2-amino etoxi)-etoxi]acético con éster Fmoc *N*-hidroxisuccinimida. Alternativamente, el intermediario-1 está disponible comercialmente y puede adquirirse como tal. El grupo protector Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo del grupo amino del ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre fue entonces acoplado al ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético mediante el uso de 1-hidroxibenzotriazol(HOBt) y *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIPC) que rindieron ácido 2-[2-[2-[[2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acetil] amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl- Trt-resina. El grupo Fmoc se eliminó entonces por desbloqueo selectivo del grupo amino del ácido 2-[2-[2-[[2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se acopló luego a Fmoc-Glu-OtBu mediante el uso de HOBt y DIPC para obtener ácido 2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-Fmoc-amino-5-terc-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El ácido 2-[2-[2-

[[2-[2-[2-[(4S)-4-Fmoc-amino-5-*tert*-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina se desbloqueó selectivamente mediante el uso de piperidina y luego se acopló con éster mono *tert*-butilíco de ácido octadecanodioico para dar el intermediario-2 específicamente ácido [2-[2-[2-[[2-[2-[(4S)-5-*tert*-butoxi-4-[(18-*tert*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]etoxi]etoxi]acetil]amino] etoxi]etoxi] acético]- 2-Cl-Trt-resina. El intermediario 2 se escindió entonces de 2-Cl-Trt-resina mediante el uso de trifluoroetanol:DCM (1:1). El compuesto resultante se reaccionó entonces con *N*-hidroxisuccinimida (HOSu) en presencia de isobutilcloroformiato (IBCF) y *N*-metilmorfolina (NMM) seguido de desprotección con ácido trifluoroacético para producir el compuesto del título (resto A-OSu, intermediario-3). Todo el proceso también puede representarse como se representa esquemáticamente en la figura 1B.

## 2. Preparación del éster de *N*-palmitoil-L- $\gamma$ -glutamyl succinimida (resto B-OSu)



Resto B-OSu

El éster de alfa-*tert*-butilo de ácido L-glutámico (H-Glu-OtBu) se reaccionó con ácido palmítico en presencia de IBCF y NMM para producir  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-C(O)-Glu-OtBu}$ , que se reaccionó entonces con HOSu en presencia de IBCF y NMM para producir  $\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{14}\text{-C(O)-Glu(OSu)-OtBu}$ , que se desprotegió luego con ácido trifluoroacético para producir el resto B-OSu.

## 3. Preparación del ácido 18-[[[(1S)-1-carboxi-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoilamino]butilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico (resto C-OSu)

La cadena lateral de ácidos grasos activados, el resto C-OSu se preparó mediante el uso de la síntesis de fase sólida mediante el uso de la resina de cloruro de 2-clorotritilo como se representa esquemáticamente en la figura 2. El ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético se unió a la resina de cloruro de 2-clorotritilo en presencia de DIPEA para producir ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo protector Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo del grupo amino mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se activó luego mediante el uso de p-nitrofenilcloroformiato en THF y DIPEA seguido de la reacción con sal de clorhidrato de Fmoc-amino butilamina en THF: DMAc y DIPEA, que produjeron ácido 2-[2-[2-(4-Fmoc-aminobutilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se acopló luego a Fmoc-Glu-OtBu mediante el uso de HOBt y DIPC, que produjeron ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)- 4-Fmoc-amino-5-*tert*-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]butilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)-4-Fmoc-amino-5-*tert*-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]- butilcarbamoilamino]etoxi] etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina se desbloqueó selectivamente mediante el uso de piperidina y luego se acopló con éster mono *tert*-butilíco de ácido octadecanodioico para dar el intermediario ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)-5-*tert*-butoxi-4-[(18-*tert*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]butilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El intermediario se escindió entonces de 2-Cl-Trt-resina mediante el uso de trifluoroetanol:DCM (1:1) para obtener ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)-5-*tert*-butoxi-4-[(18-*tert*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]butilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético (LC- MS= m/z: 814,56 (M+H<sup>+</sup>)). El compuesto resultante se reaccionó entonces con HOSu en presencia de diciclohexil carbodiimida (DCC) para producir un intermediario protegido con succinimida, que se desprotegió con ácido trifluoroacético para producir el compuesto del título (resto C-OSu).

## 4. Preparación del ácido 18-[[[(1S)-1-carboxi-4-[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilamino]-1,1-dimetil-2-oxo-etil]amino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico (resto D-OSu)

La cadena lateral de ácidos grasos se preparó mediante el uso de la síntesis de fase sólida mediante el uso de resina de cloruro de 2-clorotritilo como se representa esquemáticamente en la figura 3. El ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético se unió a la resina de cloruro de 2-clorotritilo en presencia de DIPEA para producir ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo protector Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo del

grupo amino mediante el uso de piperidina seguido de acoplamiento con Fmoc-Aib-OH en THF: DMAc mediante el uso de DIPC y HOBt que produjo ácido 2-[2-[2-[(2-Fmoc-amino-2-metil-propanoil)amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se acopló con Fmoc-Glu-OtBu mediante el uso de HOBt y DIPC para producir ácido 2-[2-[2-[[[4S]-4-Fmoc-amino-5-  
5 terc-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]-2-metil-propanoil] amino] etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo Fmoc del compuesto resultante se desbloqueó selectivamente mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se acopló luego con éster mono *terc*-butilíco de ácido octadecanodioico para dar ácido 2-[2-[2-[[[4S]-5-*terc*-butoxi-4-[(18-*terc*-butoxi-18-oxo- octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]-2-metil-propanoil]-amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El intermediario se escindió entonces de 2-Cl-Trt-resina mediante el uso de trifluoroetanol:DCM (1:1) para  
10 obtener ácido 2-[2-[2-[[[4S]-5-*terc*-butoxi-4-[(18-*terc*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]-2-metil-propanoil]amino]etoxi]etoxi]acético (LCMS= m/z: 786,39 (M+H+)). El compuesto resultante se reaccionó entonces con HOSu en presencia de DCC para producir un intermediario protegido con succinimida, que se desprotegió con ácido trifluoroacético para producir el compuesto del título (resto D-OSu).

#### 5. Preparación del ácido 18-[[[1S]-1-carboxi-4-[3-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoilamino]propilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico (resto E-OSu)

La cadena lateral de ácidos grasos se preparó mediante el uso de la síntesis de fase sólida mediante el uso de resina de cloruro de 2-clorotritilo como se representa esquemáticamente en la figura 4. El ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético se unió a la resina de cloruro de 2-clorotritilo en presencia de DIPEA para producir ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo protector Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo del  
20 grupo amino mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se activó luego mediante el uso de p-nitrofenilcloroformiato en THF y DIPEA seguido de la reacción con 1,3-diaminopropano en THF: DMAc en presencia de DIPEA mediante el uso de HOBt para formar ácido NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-C(O)-{(2-(2-amino-etoxi)-etoxi)-acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo amino libre se acopló luego a Fmoc-Glu-OtBu mediante el uso de HOBt y DIPC, que produjo ácido 2-[2-[2-[3-[[[4S]-4-Fmoc-amino-5-*terc*-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino] propilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El ácido 2-[2-[2-[3-[[[4S]-4-Fmoc-amino-5-*terc*-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]propilcarbamoilamino]etoxi]-  
25 etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina resultante se desbloqueó selectivamente mediante el uso de piperidina y luego se acopló con éster mono *terc*-butilíco de ácido octadecanodioico para dar ácido 2-[2-[2-[3-[[[4S]-5-*terc*-butoxi-4-[(18-*terc*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino] -5 -oxo- pentanoil]amino] -propil carbamoilamino]etoxi]etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El intermediario se escindió entonces de 2-Cl-Trt-resina mediante el uso de trifluoroetanol:DCM (1:1) para obtener ácido  
30 2-[2-[2-[3-[[[4S]-5-*terc*-butoxi-4-[(18-*terc*-butoxi-18-oxo- octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]-propilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético (LCMS= m/z: 801,41 (M+H+)). El compuesto resultante se reaccionó entonces con HOSu en presencia de dicitclohexil carbodiimida (DCC) para producir un intermediario protegido con succinimida, que se desprotegió con ácido trifluoroacético para producir el compuesto del título (resto E-OSu).

#### 6. Preparación del ácido 18-[[[1S]-1-carboxi-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoilamino]-1-piperidil]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico (resto F-OSu)

La cadena lateral de ácidos grasos se preparó mediante el uso de la síntesis de fase sólida mediante el uso de resina de cloruro de 2-clorotritilo como se representa esquemáticamente en la figura 5. El ácido 2-[2-(2-Fmoc-amino etoxi)etoxi]acético se unió a la resina de cloruro de 2-clorotritilo en presencia de DIPEA para producir ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo protector Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo del  
40 grupo amino mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se activó luego mediante el uso de p-nitrofenilcloroformiato en THF y DIPEA seguido de reacción con 4-amino-Boc-piperidina en THF: DMAc en presencia de DIPEA mediante el uso de HOBt que produjo ácido (2-[2-[2-(4-Boc-piperidilcarbamoilamino) etoxi]etoxi]acético-2- Cl-Trt-resina. El compuesto resultante en la escisión mediante el uso de ácido trifluoroacético produjo ácido 2-[2-[2-(4-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético que en reacción adicional con Fmoc-OSu en presencia de trietilamina (TEA) produjo ácido 2-[2-[2-(4-Fmoc-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético. El compuesto obtenido se unió luego a la resina de cloruro de 2-clorotritilo en presencia de DIPEA para producir ácido 2-[2-[2-(4-Fmoc-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El grupo Fmoc se eliminó por desbloqueo selectivo mediante el uso de piperidina y el grupo amino libre se acopló luego con Fmoc-Glu-OtBu mediante el uso de HOBt y  
45 DIPC, que produjo ácido 2-[2-[2-[[[1]-[4S]-4-amino-5-*terc*-butoxi-5- oxo-pentanoil]-4-piperidil]carbamoilamino]etoxi]etoxi] acético-2-Cl-Trt-resina. El compuesto resultante fue desbloqueado selectivamente mediante el uso de piperidina y se acopló luego con éster mono *terc*-butilíco de ácido octadecanodioico para dar ácido 2-[2-[2-[[[1]-[4S]-5-*terc*-butoxi-4-[(18-*terc*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]-4-piperidil]carbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina. El intermediario se escindió entonces de 2-Cl-Trt-resina  
50

mediante el uso de trifluoroetanol:DCM (1:1) para obtener ácido 2-[2-[2-[[1-[(4S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]-4-piperidil] carbamoilamino]etoxi]etoxi]acético (LCMS= m/z: 827,40 (M+H<sup>+</sup>)). El compuesto resultante se reaccionó entonces con HOSu en presencia de DCC para producir un intermediario protegido con succinimida, que se desprotegió mediante el uso de ácido trifluoroacético para producir el compuesto del título, resto F-OSu.

## Ejemplo 2: Síntesis del compuesto 1:

**Péptido N-ε<sup>26</sup>-[2-(2-[2-(2-[2-(4-(17-carboxiheptadecanoilamino)-4(S)carboxibutirilamino] etoxi)etoxi]acetilamino)etoxi]etoxi]acetil[[Aib<sup>8</sup>, Arg<sup>34</sup>, Leu<sup>38</sup> GLP-1 (7-38)**

### Parte A. Síntesis del péptido lineal original Aib<sup>8</sup>, Arg<sup>34</sup>, Leu<sup>38</sup> GLP-1(7-38)

El péptido original se sintetizó mediante un método de fase sólida. La resina inicial usada para la síntesis fue la resina Wang. Se usó leucina protegida con Fmoc para el acoplamiento con la resina Wang. El acoplamiento se realizó mediante el uso de diisopropilcarbodiimida, *N*-hidroxibenzotriazol (DIC-HOBt) como reactivo de acoplamiento en presencia de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) que produjo Fmoc-Leu-resina Wang. El desbloqueo selectivo del grupo amino de Fmoc-Leu-resina Wang mediante el uso de piperidina seguido del acoplamiento con Fmoc-Gly-OH mediante el uso de HOBt y DIPC produjo Fmoc-Gly-Leu-resina Wang. Esto completa un ciclo. Se usó anhídrido acético y diisopropiletil amina/piridina para terminar los grupos amino no acoplados en cada acoplamiento de aminoácidos. Las 2 etapas anteriores, es decir, el desbloqueo selectivo de la protección con Fmoc- del aminoácido unido a la resina y el acoplamiento del siguiente residuo de aminoácido en la secuencia con el grupo amino protegido por Fmoc se repitieron para los 30 residuos de aminoácidos restantes. El desbloqueo selectivo, es decir, la desprotección del grupo Fmoc se realizó mediante el uso de piperidina y el acoplamiento con el siguiente aminoácido protegido por Fmoc se realizó mediante el uso de HOBt/DIPC. La cadena lateral de los aminoácidos protegidos por Fmoc se protegieron ortogonalmente, por ejemplo, grupo hidroxilo de la serina, tirosina o treonina se protegieron con el grupo terc-butilo (-tBu), el grupo amino y guanido de lisina y arginina se protegieron con el grupo terc-butiloxicarbonilo (-Boc) y 2,2,4,6,7-pentametilidihidrobenzofuran-5-sulfonilo (-Pbf) respectivamente, el imidazol de la histidina se protegió con tritilo (-Trt) y los grupos ácido carboxílico del ácido aspártico o ácido glutámico se protegieron con el grupo -tBu. Las dos etapas mencionadas anteriormente, es decir, el desbloqueo selectivo y luego el acoplamiento con el siguiente aminoácido protegido por Fmoc se realizaron para obtener Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(Ot-Bu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-resina. El desbloqueo de Fmoc-His(Trt)-Aib-Glu(OtBu)-Gly-Thr(tBu)-Phe-Thr(tBu)-Ser(tBu)-Asp(OtBu)-Val-Ser(tBu)-Ser(tBu)-Tyr(tBu)-Leu-Glu(OtBu)-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys(Boc)-Glu(OtBu)-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg(Pbf)-Gly-Arg(Pbf)-Gly-Leu-Resin using piperidine followed by cleavage and de-protection using trifluoroacetic acid with ethane-1,2-dithiol resulted in crude H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH (péptido Aib<sup>8</sup>, Arg<sup>34</sup>, Leu<sup>38</sup> GLP-1 (7-38)) que se purificó mediante HPLC.

### Parte B:

El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto A-OSu sobre el purificado (péptido lineal) H-His-Aib-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Ser-Tyr-Leu-Glu-Gly-Gln-Ala-Ala-Lys-Glu-Phe-Ile-Ala-Trp-Leu-Val-Arg-Gly-Arg-Gly-Leu-OH obtenido en la Parte A, en acetonitrilo a pH de aproximadamente 10 dio como resultado el péptido del título crudo que se purificó mediante HPLC preparativa. La caracterización de los compuestos se proporciona en la tabla 3.

### Ejemplo 3: Preparación de los compuestos 2, 3, 5, 9, 10 y 12

Los péptidos lineales de los compuestos 2, 3, 5, 9, 10 y 12 se prepararon mediante un método de fase sólida según el proceso análogo dado para el ejemplo 1, Parte A. El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto A-OSu al seguir el proceso del ejemplo 1, Parte B sobre los respectivos péptidos lineales dieron el compuesto 2, 3, 5, 9, 10 y 12.

### Ejemplo 4: Preparación de los compuestos 4 y 11:

Los péptidos lineales de los compuestos 4 y 11 se prepararon mediante un método de fase sólida según el proceso análogo dado para el ejemplo 2, Parte A, excepto aquí, la D-leucina protegida con Fmoc se acoplaron primero con resina Wang y luego se acoplaron secuencialmente a otros aminoácidos. El injerto de cadena de ácidos grasos

activada, resto A-OSu sobre el péptido lineal respectivo al seguir el proceso del ejemplo 2, la Parte B proporcionó el compuesto 4 y 11.

#### **Ejemplo 5: Preparación del compuesto 8**

5 El péptido lineal se preparó mediante un método de fase sólida según el proceso análogo dado para el ejemplo 2, Parte A excepto aquí, la isoleucina protegida por Fmoc se acopló primero con la resina Wang y luego se acoplaron secuencialmente a otros aminoácidos. El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto A-OSu sobre el péptido lineal al seguir el proceso del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 8.

#### **Ejemplo 6: Preparación del compuesto 6**

10 El péptido lineal se preparó mediante el método de fase sólida según el proceso análogo dado para el ejemplo 2, Parte A. El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto B-OSu sobre el péptido lineal al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 6.

#### **Ejemplo 7: Preparación del compuesto 7**

El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto B-OSu sobre el péptido lineal del ejemplo 2, Parte A, al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 7.

#### **15 Ejemplo 8: Preparación del compuesto 13**

El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto C-OSu sobre el péptido lineal del ejemplo 1, Parte A, al seguir el proceso análogo del ejemplo 1, Parte B proporcionó el compuesto 13.

#### **Ejemplo 9: Preparación del compuesto 14**

20 El péptido lineal se preparó mediante el método de fase sólida según el proceso análogo dado para el ejemplo 2, Parte A. El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto C-OSu sobre el péptido lineal al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 14.

#### **Ejemplo 10: Preparación del compuesto 15**

25 El péptido lineal se preparó mediante el método de fase sólida según el proceso análogo dado para el ejemplo 2, Parte A que comienza con isoleucina protegida por Fmoc se acopló primero con la resina Wang y luego se acoplaron secuencialmente a otros aminoácidos. El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto C-OSu sobre el péptido lineal al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 15.

#### **Ejemplo 11: Preparación del compuesto 16**

El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto D-OSu sobre el péptido lineal del ejemplo 2, Parte A, al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 16.

#### **30 Ejemplo 12: Preparación del compuesto 17**

El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto E-OSu sobre el péptido lineal del ejemplo 2, Parte A al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 17.

#### **Ejemplo 13: Preparación del compuesto 18**

35 El injerto de cadena de ácidos grasos activada, resto F-OSu sobre el péptido lineal del ejemplo 2, Resto A, al seguir el proceso análogo del ejemplo 2, Parte B proporcionó el compuesto 18.

Los datos de caracterización de los compuestos sintetizados de la presente descripción se proporcionan más abajo en la siguiente tabla 3.

Tabla 3: Datos de caracterización de compuestos representativos de la presente descripción

Comp. #	Datos de LCMS	Pureza de HPLC
1	m/z = 1057,52 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4226,05	98,32 % (Método B2), RT=24,85 min.
2	m/z = 1061,74 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4242,93	99,02 % (Método B1), RT=18,53 min.
3	m/z = 1087,65 (M-4H) <sup>-4</sup> , masa calculada=4354,63	98,12 % (Método B1), RT=18,48 min.
4	m/z = 1055,68 (M-4H) <sup>-4</sup> , masa calculada= 4226,75	98,97 % (Método B1), RT=18,32 min.
5	m/z = 1057,88 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4227,49	96,75 % (Método B1), RT=17,09 min.
6	m/z = 967,26 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada: 3865,01	98,68 % (Método B3), RT=44,04 min.
7	m/z= 968,53 (M-4H) <sup>-4</sup> , masa calculada= 3878,15	97,39 % (Método B3), RT=27,79 min.
8	m/z = 1057,72 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4226,85	95,70 % (Método B1), RT=16,62 min.
9	m/z = 1061,67 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4242,65	95,15 % (Método B1), RT=16,48 min.
10	m/z = 1058,18 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4228,69	93,66 % (Método B1), RT=16,13 min.
11	m/z = 1056,95 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada: 4223,77	95,70 % (Método B2), RT=24,46 min
12	m/z = 1405,12 (MH <sub>3</sub> <sup>3+</sup> ), masa calculada: 4212,34	97,51 % (Método B1), RT=19,06 min.
13	m/z = 1049,59 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4194,33	96,01 % (Método B2), RT=25,16 min.
14	m/z = 1050,13 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada = 4196,49	92,06 % (Método B2), RT=24,55 min.
15	m/z = 1049,61 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada = 4194,41	94,41 % (Método B2), RT=24,82 min.
16	m/z = 1042,34 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada = 4165,32	94,56 % (Método B2), RT=25,26 min.
17	m/z = 1046,18 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada = 4180,72	94,33 % (Método B2), RT=25,17 min.
18	m/z = 1052,77 (MH <sub>4</sub> <sup>4+</sup> ), masa calculada= 4207,08	93,12 % (Método B2), RT=24,92 min.

**Ejemplo 14: Prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en ratas; inyección única; 1 mg/kg**

Los animales se dividieron en tres grupos - un grupo de control normal, un grupo de prueba y un tercer grupo de semaglutida, con 4 animales en cada grupo. Los animales se pusieron en ayuno durante 12 horas antes del inicio de la OGTT. Para los animales del grupo de prueba, el compuesto 1 se inyectó por vía subcutánea a una dosis de 1 mg/kg. Para el grupo de semaglutida, se inyectó una dosis de 1 mg/kg por vía subcutánea. Después de 22 horas, 166 horas y 334 horas de inyección subcutánea del fármaco en investigación o semaglutida, se midió la glucemia con un glucosímetro (mediciones a tiempo 0). A todos los animales se les administró entonces 2 g/kg de solución de glucosa por vía oral. La glucemia se midió a los 20, 40, 60, 90 y 120 minutos después de la prueba de tolerancia a la glucosa. Se registró el peso corporal y la ingestión de alimentos. Los datos de glucemia se analizaron mediante el uso de un ANOVA bidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni mediante el uso de PRISM (Graph Pad versión 5.03). Los datos ABC<sub>0-120 min</sub> de glucemia, se analizaron mediante el uso de la prueba t.

Los polipéptidos de la presente descripción han mostrado un efecto de reducción de glucosa significativo en comparación con el grupo de control cuando se estudiaron en la prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT) en

ratas. Por ejemplo, la figura 6 proporciona un cambio en el nivel de glucemia desde el tiempo 0 hasta 120 min después de 22 horas y 46 horas en el grupo de prueba que administró el compuesto 1 y el grupo de tratamiento con semaglutida. A las 22 horas después de la administración de la única dosificación, el compuesto 1 mostró una reducción estadísticamente significativa en el nivel de glucemia con  $p < 0,001$  frente al control normal en ANOVA seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni. El efecto de reducción de la glucosa del compuesto 1 fue superior al efecto de reducción de la glucosa observado con semaglutida (véase la figura 6A). La superioridad del efecto de reducción de la glucosa del compuesto 1 se observó incluso después de 46 horas de administración subcutánea (figura 6B). Además, tanto el compuesto 1 como la semaglutida mostraron una reducción estadísticamente significativa en la ingestión de alimentos en comparación con el control cuando se observaron en el día 2 así como también en el día 4 (véase las tablas 4 y 5). La ingestión de alimentos reducida mostrada por el compuesto 1 en el día 4 fue mayor que la semaglutida (véase la tabla 5). En términos de reducción de peso corporal, solo el compuesto de prueba mostró una reducción significativa del peso corporal en el día 4.

**Tabla 4: Efecto del tratamiento sobre la ingestión de alimentos y el peso corporal el día 2**

Consumo de alimentos (g) (día 0 a día 2)			Peso corporal (g) (día 2)		
	Media	SD	Media	SD	% de cambio frente al inicio
Control normal	33,0	4,7	480,6	15,6	8,89
Compuesto 1	2,63***	2,5	365,6	21,0	-9,33
Semaglutida	5,03***	3,4	428,1	42,3	-7,65

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al control normal; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni

**Tabla 5: Efecto del tratamiento sobre la ingestión de alimentos y el peso corporal el día 4**

Consumo de alimentos (g) (día 0 a día 4)			Peso corporal (g) (día 4)		
	Media	SD	Media	SD	% de cambio frente al inicio
Control normal	90,5	5,6	491,3	16,9	2,1
Compuesto 1	43,25***,##	2,8	436,2*	21,1	-7,5
Semaglutida	55,73***	4,1	427,2	42,3	-5,3

\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al control normal; ANOVA unidireccional seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  frente a semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni

Se encontró sorprendentemente que los compuestos que tienen X33 como Leu e Ile mostraron una reducción significativa de la glucemia en los estudios dados, mientras que los compuestos con aminoácidos diferentes de Leu e Ile tuvieron un efecto significativamente menor en la reducción de la glucemia. El polipéptido de la presente descripción ha mostrado una reducción significativa de la glucemia en comparación con el grupo de control. También se probaron compuestos que tienen aminoácidos distintos de Leu o Ile en posiciones X33. Por ejemplo, la Leu en la 32da posición en el compuesto 1 (SEQ ID NO: 05) se reemplazó con Lys y Ser para obtener compuestos Std-1 y Std-2, respectivamente. Std-1 y Std-2 mostraron solo una reducción de aproximadamente el 35 y 15 % en la ABC<sub>0-120min</sub> de glucemia (tabla 6).

**Tabla 6: Porcentaje de reducción en la ABC<sub>0-120min</sub> de glucemia en la prueba de OGTT a una dosis de 1 mg/Kg después de 24 horas.**

Comp. #	% de reducción de glucosa	Comp/std semaglutida	Comp. #	% de reducción de glucosa	Comp/std liraglutida
Std-1	35,1	0,71	6	75,8	1,83
Std-2	14,8	0,30	7	71,9	1,73
Semaglutida	49,3		Liraglutida	41,5	



De manera similar, el compuesto 6 que se diferencia de la liraglutida en tener una Leu adicional en la 32da posición y el compuesto 7 que se diferencia de la liraglutida al tener el 2do aminoácido Ala reemplazado con Aib y tener una Leu como un 32do aminoácido adicional, mostró un efecto de reducción de la glucemia a las 24 horas que fue significativamente mayor que la liraglutida (tabla 6).

Una vez que se determinó que el compuesto 1 era significativamente mejor en términos de reducción de glucosa, ingestión de alimentos y reducción de peso corporal, se llevaron a cabo experimentos para determinar la duración de la acción del compuesto de la presente invención. El efecto de los compuestos representativos de la presente invención (compuesto 1, 13 y 16) después de 166 horas (7 días) y 334 horas (14 días) se estudió y se comparó con el de la semaglutida. Los compuestos se probaron según el método proporcionado más abajo:

Los animales se dividieron en tres grupos: un grupo de control normal, un grupo de prueba y un tercer grupo de semaglutida, con 4 animales en cada grupo. Los animales se pusieron a ayunar durante 12 horas antes del inicio de la OGTT. Para los animales del grupo de prueba, el compuesto 1, el compuesto 13 y el compuesto 16 se inyectaron por vía subcutánea a una dosis de 1 mg/kg. Para el grupo de semaglutida, se inyectó una dosis de 1 mg/kg por vía subcutánea. Después de 22 horas, 166 horas y 334 horas de inyección subcutánea de compuesto de prueba o semaglutida, se midió la glucemia con un glucómetro (mediciones a tiempo 0). A todos los animales se les administró entonces 2 g/kg de solución de glucosa por vía oral. La glucemia se midió a los 20, 40, 60, 90 y 120 minutos después de la prueba de tolerancia a la glucosa. Se registró el peso corporal y la ingestión de alimentos. Los datos de glucemia se analizaron mediante el uso de un ANOVA bidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni mediante el uso de PRISM (Graph Pad versión 5.03). Los datos ABC<sub>0-120 min</sub> de glucemia, se analizaron mediante el uso de la prueba t.

La tabla 7 proporciona la reducción del ABC de la glucemia para los compuestos representativos de la presente invención (compuesto 1, 13 y 16) en comparación con el grupo de control después de 1 día, 7 días y 14 días de administración.

**Tabla 7: Porcentaje de reducción en la ABC<sub>0-120min</sub> de glucemia en la prueba de OGTT a una dosis de 1 mg/kg.**

Compuesto #	Tiempo	ABC de glucemia (mg/dl*min)	Cambio en ABC (mg/dl*min)
		Media	
Semaglutida Exp. 1	22 horas	5458,0	-63,4
	168 horas	12785,0	-25,5
	336 horas	16223,0	-2,4
Comp. 1 Exp. 1	22 horas	3173,0	-78,7
	168 horas	5941,0	-65,4
	336 horas	11920,0	-28,3
Comp. 13 Exp. 1	22 horas	2795,0	-81,2
	168 horas	6950,0	-59,5
	336 horas	11368,0	-31,6
Semaglutida Exp. 2	22 horas	4258	-50
	168 horas	7410	-26,6
	336 horas	8023,0	-5,5
Comp. 16 Exp. 2	22 horas	1646	-80,7
	168 horas	4283	-57,6
	336 horas	8295,0	-2,3

Los compuestos 1 y 13 se estudiaron y se compararon con la semaglutida en un experimento (Exp. 1) y el compuesto 16 se estudió y se compararon con la semaglutida en un experimento separado (Exp. 2). Después de 168 horas de la inyección, los compuestos 1, 13 y 16 de la presente invención mostraron una reducción de aproximadamente el 60 % en ABC de glucemia en comparación con el nivel de glucemia al tiempo cero. Por otro lado, la semaglutida mostró una reducción de aproximadamente el 25 % en el nivel de glucemia con respecto al nivel de glucemia al tiempo cero.

Se realizaron observaciones similares en la cantidad de alimentos consumidos y el cambio de peso corporal. Como

puede observarse en la tabla 8 más abajo, los animales administrados con los compuestos representativos (compuesto 1, 13 y 16) consumieron significativamente menos alimento en comparación con los animales administrados con la semaglutida. El compuesto 16 mostró una reducción sustancial del peso corporal que demostraba la utilidad potencial para el tratamiento de la obesidad.

5 **Tabla 8: Efecto sobre el consumo de alimentos y el peso corporal en la prueba de OGTT a una dosis de 1 mg/kg**

Compuesto #	Tiempo	Consumo de alimentos (g)	Cambio de peso corporal (%)
		Media	Media
<b>Semaglutida Exp. 1</b>	48 h	17,5	-6,5
	154 h	86,3	4,5
	324 h	107,9	11,8
<b>Comp. 1 Exp. 1</b>	48 h	8,3	-9,8
	154 h	69,6	5,2
	324 h	99,4	9,3
<b>Comp. 13 Exp. 1</b>	48 h	8,4	-10,2
	154 h	62,3	4,5
	324 h	82,44	8,2
<b>Semaglutida Exp. 2</b>	48 h	19,3	-8,7
	154 h	50,4	0,2
	324 h	96,8	3,8
<b>Comp. 16 Exp. 2</b>	48 h	5,9	-10,7
	154 h	44,1,0	-7,0
	324 h	104,3	-4,3

#### **Ejemplo 15: Reducción de la HbA1c en ratones diabéticos tipo 2 db/db después del tratamiento crónico**

Este estudio se realizó en un modelo de ratón diabético. Los animales se dividieron en tres grupos de tratamiento- un grupo de control diabético, un grupo de prueba y un grupo de tratamiento con semaglutida. El compuesto de la presente descripción se inyectó por vía subcutánea a una dosis de 0,3 mg/kg una vez al día durante 3 días (qd3) seguido de una dosis de 0,1 mg/kg cada día alternativo durante 7 dosis (q2d7) seguido de una dosis de 0,1 mg/kg una vez cada cuatro días durante dos ciclos de dosis (q4d2). El mismo régimen de dosificación se administró en el grupo de tratamiento con semaglutida. Las mediciones de los niveles de glucemia y el peso corporal se realizaron a diario. El % de HbA1c se midió el día 0, el día 7, el día 14 y el día 27 por cromatografía en columna. La ingestión de alimentos acumulada se calculó el día 27. Los datos del % de HbA1C se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni mediante el uso de PRISM (Graph Pad versión 5.03).

Los animales del grupo de prueba administrados con el compuesto 1 mostraron una reducción estadísticamente significativa en los niveles de glucemia en comparación con el grupo de control diabético (véase la figura 7), y el efecto fue superior al grupo de tratamiento con semaglutida en la última fase del estudio. Los animales del grupo de prueba administrados con el compuesto 1 mostraron una reducción significativa en la ingestión de alimentos como puede observarse en los resultados proporcionados en la figura 8. La figura 8 proporciona la ingestión de alimentos acumulada del 0 al 27<sup>mo</sup> día por el control y ratones db/db tratados con el compuesto de prueba. Tanto el compuesto de prueba como la semaglutida mostraron una reducción estadísticamente significativa en la ingestión de alimentos en comparación con el grupo de control diabético. Además, el compuesto de prueba mostró una ingestión de alimentos significativamente menor, en comparación con semaglutida. En el mismo estudio, el compuesto 1 también ha mostrado una reducción significativa del peso corporal en comparación con el grupo de control diabético. La figura 9 proporciona el resultado del cambio del % en el peso corporal para el grupo de control y de prueba del día 0 al día 27. El compuesto de prueba 1 mostró una reducción significativa del -16 % en comparación con el -8 % observado en el grupo de

tratamiento con semaglutida (véase la figura 09).

En la diabetes mellitus, cantidades más altas de HbA1c, que indican un control más deficiente de los niveles de glucemia, se han asociado con enfermedades cardiovasculares, nefropatía, neuropatía y retinopatía. En un estudio de 27 días, el compuesto 1 mostró una reducción estadísticamente significativa en el nivel de HbA1c en ratones diabéticos tipo 2 db/db después del tratamiento crónico. La tabla 9 más abajo y la figura 10 proporcionan el nivel de HbA1c a los 0 y 27 días en el grupo de control diabético y en el grupo después del tratamiento crónico con el compuesto 1. El efecto fue estadísticamente significativo incluso cuando se comparó con la semaglutida.

**Tabla 9: Efecto del tratamiento sobre los niveles de % de HbA1c en ratones db/db**

Punto temporal (días)	% de HbA1C										
	Control diabético (DC)			Compuesto 1				Semaglutida			
	Media	SD	n	Media	SD	n	% de cambio frente al DC	Media	SD	n	% de cambio frente al DC
0	4,70	0,52	6	4,87	0,59	6	-	5,05	0,35	5	-
27	7,30	1,17	6	3,73***##	0,86	6	-3,57	5,03***	0,69	5	-2,26

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 frente al control diabético; ANOVA bidireccional seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 frente a semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni

En un estudio separado, se estudiaron los compuestos de prueba 1, 13 y 16 y se compararon con la semaglutida para su efecto sobre el nivel de HbA1c e insulina y el consumo de alimentos acumulado, el cambio de peso corporal y la ABC de glucemia. El estudio se realizó de manera similar a la anterior en un modelo de ratón diabético. Los animales se dividieron en tres grupos de tratamiento - un grupo de control diabético, un grupo de prueba y un grupo de tratamiento con semaglutida. Los compuestos representativos de la presente descripción, el compuesto 1, el compuesto 13 y el compuesto 16, se inyectaron por vía subcutánea a una dosis de 3,04 o 6,078 nM (cada día alternativo hasta el día 28 (q2d\*15)). El mismo régimen de dosificación se administró en el grupo de tratamiento con semaglutida. Las mediciones de los niveles de glucemia y el peso corporal se realizaron a diario. El % de HbA1c, la insulina se midió el día 0, el día 14 y el día 29. La ingestión de alimentos acumulada y el cambio de peso corporal se calcularon los días 14 y 29. El % de HbA1c, los datos de insulina se analizaron mediante ANOVA bidireccional seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni mediante el uso de PRISM (Graph Pad versión 5.03). Mientras que los datos de la ABC de glucemia, el cambio de peso corporal y la ingestión de alimentos acumulada se analizaron por ANOVA unidireccional seguido de las pruebas posteriores de Bonferroni mediante el uso de PRISM (Graph Pad versión 5.03). Desde el día 29 hasta el día 45, los animales se mantuvieron en el período de recuperación durante el cual no se administró ningún tratamiento con fármacos. La glucemia y el peso corporal se midieron durante este período. El día 45 se midieron los cambios de peso corporal, el % de HbA1c y la insulina.

Los resultados se proporcionan en las tablas 10, 11 y 12 más abajo.

**Tabla 10: HbA1C (%):** Compuesto 1 (6,078 nM), compuesto 13 (3,04 y 6,078 nM), compuesto 16 (3,04 y 6,078 nM); (q2d\*15) (n=7)

Punto temporal (días)	% de HbA1C													
	Control diabético (DC)		Compuesto 1, 6,078 nM, q2d*15		Compuesto 13, 3,04 nM, q2d*15		Compuesto 13, 6,078 nM, q2d*15		Compuesto 16, 3,04 nM, q2d*15		Compuesto 16, 6,078 nM, q2d*15		Semaglutida, 12,15 nM, q2d*15	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
0	7,7	1,2	7,8	0,8	7,7	1,5	7,83	0,76	7,74	1,27	7,83	0,99	7,66	1,13
14	8,0	1,0	6,4 **	0,5	6,6*	0,9	6,00 ***	0,53	5,67 ***#	0,68	5,64 ***#	0,49	7,04	1,15
29	8,3	1,0	6,2 ***	0,5	6,4 ***	0,8	5,64 ***	0,51	5,33 ***#	0,39	5,16 ***#	0,24	6,47 ***	1,03
* = p < 0,05, ** = p < 0,01, *** = p < 0,001 frente al control diabético, #p < 0,05, ##p < 0,01, ###p < 0,001 frente a semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni														

**Tabla 11: Insulina (ng/ml):** Compuesto 1 (6,078 nM), compuesto 13 (3,04 y 6,078 nM), compuesto 16 (3,04 y 6,078 nM); (q2d\*15) (n=7)

Punto temporal (días)	Insulina (ng/ml)											
	Control diabético		Compuesto 1, 6,078 nM, q2d*15		Compuesto 13, 3,04 nM, q2d*15		Compuesto 13, 6,078 nM, q2d*15		Compuesto 16, 3,04 nM, q2d*15		Compuesto 16, 6,078 nM, q2d*15	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
<b>0</b>	17,6	5,5	18,0	5,8	21,7	12,1	26,2	14,0	13,9	6,6	21,8	9,6
<b>14</b>	23,0	10,7	58,1**	31,6	41,8	28,2	61,2***	23,7	50,8*	27,7	58,1**	12,5
<b>29</b>	16,9	6,6	54,7**	6,4	54,4**	27,0	59,4***	22,4	53,8**	23,5	68,2***	27,1
*=p<0,05, **=p<0,01, ***=p<0,001 frente al control diabético, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 frente a semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni												
											48,1**	25,3

**Tabla 12: Consumo de alimentos acumulado, ABC de glucemia(mg/dl\*días) y cambios de peso corporal:**  
 Compuesto 1 (6,078 nM), compuesto 13 (3,04 y 6,078 nM), compuesto 16 (3,04 y 6,078 nM); (q2d\*15)

Grupos (n=7)	Ingestión de alimentos acumulada (g) días 0-29		ABC de glucemia (día 0-29) (mg/dl*días)			Cambio de peso corporal día 29, % de cambio frente al día 0	
	Media	SD	Media	SD	% de cambio frente al control	Media	SD
Control diabético	99,3	37,16	16948,1	281,48		9,4	6,4
Compuesto 1, 6,078 nM	79,8	25,09	9194,6***	450,84	-45,75	-0,3	2,2
Compuesto 13, 3,04 nM	75,2	18,45	9515,4***	805,21	-43,86	1,2	3,8
Compuesto 13, 6,078 nM	70,4	10,85	8451,7##	612,94	-50,13	-1,1	2,4
Compuesto 16, 3,04 nM	77,4	23,82	9399,0***	680,38	-44,54	-1,4	5,4
Compuesto 16, 6,078 nM	66,7	29,48	8086,1##	623,80	-52,29	-5,5	3,1
Semaglutida, 12,155 nM	92,0	6,64	9867,9***	832,73	-41,78	0,7	3,9

\*=p<0,05, \*\*=p<0,01, \*\*\*=p<0,001 frente al control diabético, #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 frente a semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni

Los compuestos representativos de la presente descripción (compuesto 1, 13 y 16) a dosis de aproximadamente 3 nM y 6 nM mostraron una reducción significativa en la HbA1c, la glucemia, el consumo de alimentos y el peso corporal en comparación con el control (tabla 12). La reducción fue comparable a la mostrada por semaglutida a dosis de aproximadamente 12 nM. Además, el efecto se observó incluso después de 29 días (tablas 13 y 14) lo que demuestra el potencial de los compuestos de la presente invención para desarrollar un fármaco de acción prolongada que no requiera administración frecuente y, por lo tanto, añade al cumplimiento del paciente.

5

**Tabla 13: Estudio de recuperación-ABC de glucemia (mg/dl\*días)**

Grupos (n=3)	ABC de glucemia (día 30-37) (mg/dl*días)		% de cambio frente al control	ABC de glucemia (día 38-45) (mg/dl*días)		% de cambio frente al control
	Media	SD		Media	SD	
Control diabético	3591,7	47,04		3601,7	38,66	
Compuesto 1, 6,078 nM	2787,3*	17,67	-22,39	3335,7	66,11	-7,39
Compuesto 13, 3,04 nM	2588,7**	411,97	-27,93	3401,0	61,00	-5,57
Compuesto 13, 6,078 nM	2875,7	436,87	-19,94	3361,0	205,83	-6,68
Compuesto 16, 3,04 nM	2420,0**	89,71	-32,62	3284,0*	81,66	-8,82
Compuesto 16, 6,078 nM	2167,7***	210,19	-39,65	3134,7**	103,39	-12,97

(continuación)

Grupos (n=3)	ABC de glucemia (día 30-37) (mg/dl*días)		% de cambio frente al control	ABC de glucemia (día 38-45) (mg/dl*días)		% de cambio frente al control
	Media	SD		Media	SD	
Semaglutida, 12,155 nM	3032,0	182,40	-15,58	3415,7	88,82	-5.16

\*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 frente al control diabético y #p<0,05, ##p<0,01, ###p<0,001 frente a Semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni

Tabla 14: Estudio de recuperación-% de HbA1C e insulina (ng/ml)

Grupos (n=3)	% de HbA1C		Delta de HbA1C frente al DC	Insulina (ng/ml)		% de cambio de peso corporal frente al día 45	
	Media	SD		Media	SD	Media	SD
Control diabético	8,5	0,4		20,6	12,0	7,8	1,08
Compuesto 1, 6,078 nM	7,6	0,5	-0,9	30,9	8,9	5,9	3,68
Compuesto 13, 3,04 nM	7,5	0,4	-1,0	31,2	32,7	6,6	0,86
Compuesto 13, 6,0788 nM	7,3	0,4	-1,2	34,3	12,4	5,5	2,19
Compuesto 16, 3,04 nM	7,1*	0,2	-1,4	15,5	8,2	6,1	0,38
Compuesto 16, 6,078 nM	7,2*	0,5	-1,3	18,4	18,7	5,7	0,36
Semaglutida, 12,155 nM	7,8	0,3	-0,7	19,7	4,2	9,5	4,68

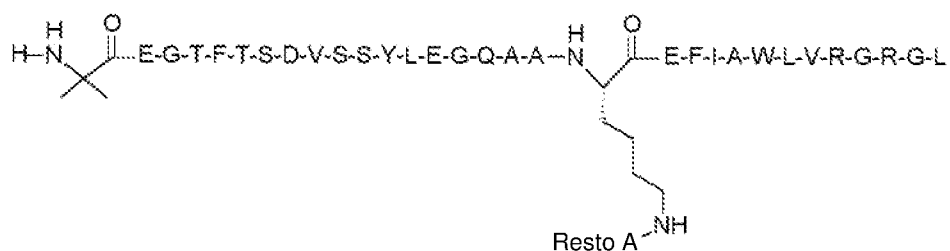
\*p<0,05. \*\*p<0,01. \*\*\*p<0,001 frente al control diabético y #p<0,05. ##p<0,01. ###p<0,001 frente a Semaglutida; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonferroni

Estos resultados demuestran que el compuesto de la presente invención puede encontrar un uso potencial para el tratamiento de la diabetes y la obesidad.

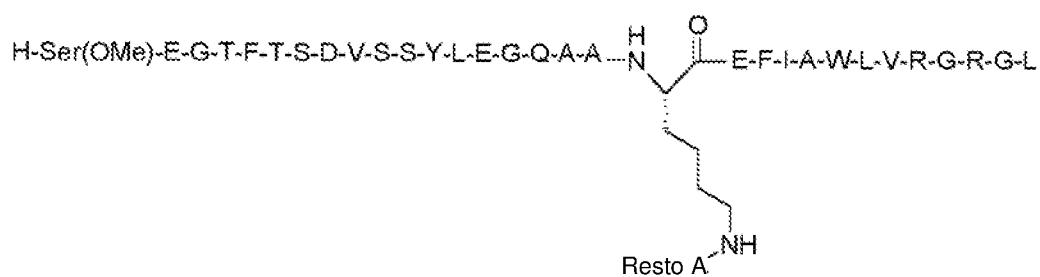
REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos:

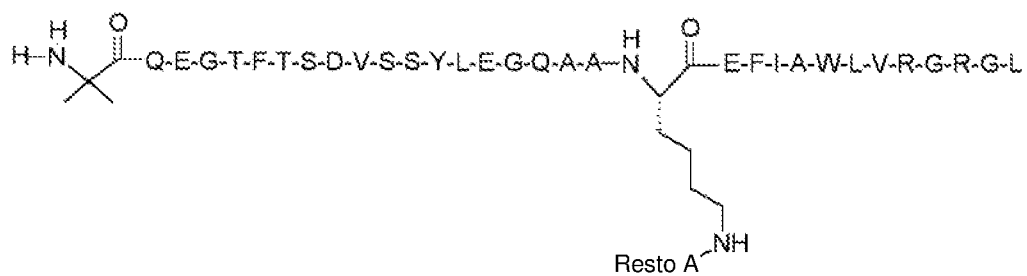
(a)



5 o  
(b)

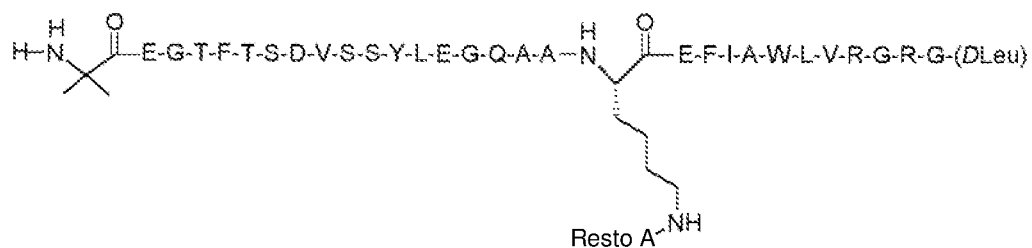


o  
(c)



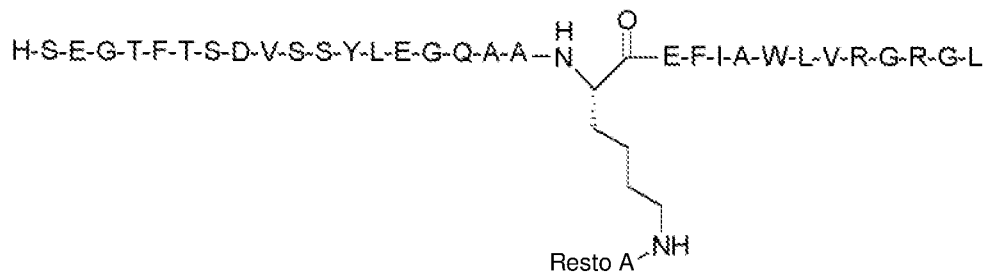
10

o  
(d)

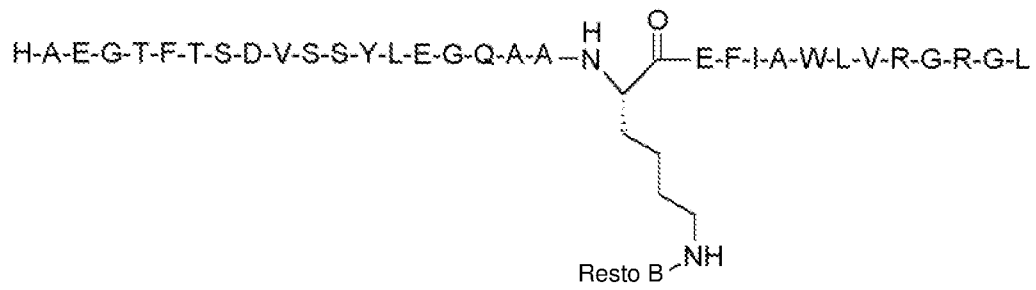




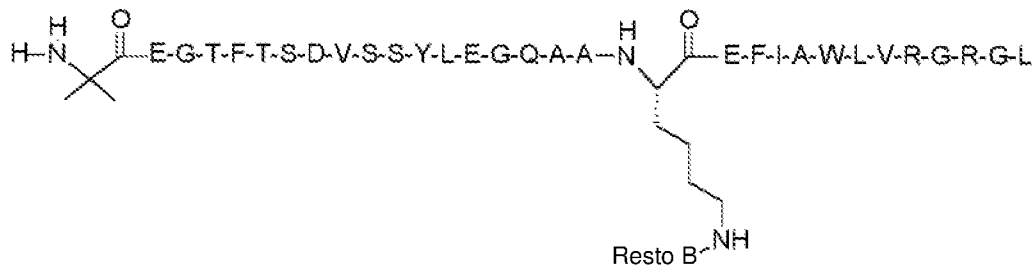
o  
(e)



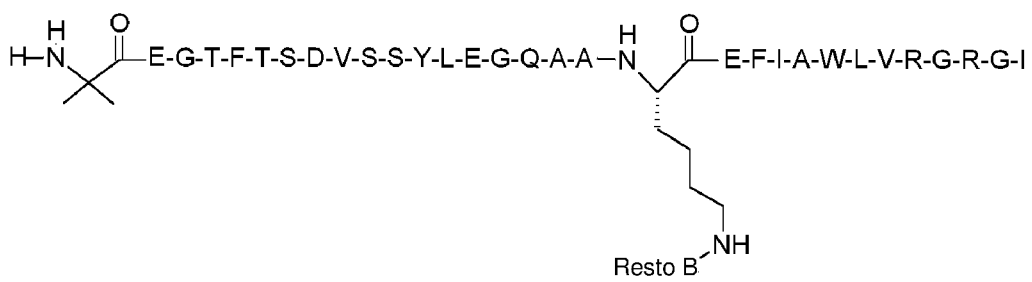
5 o  
(f)



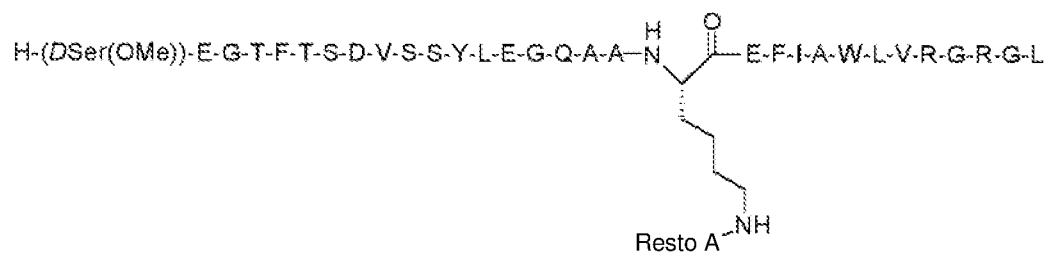
o  
(g)



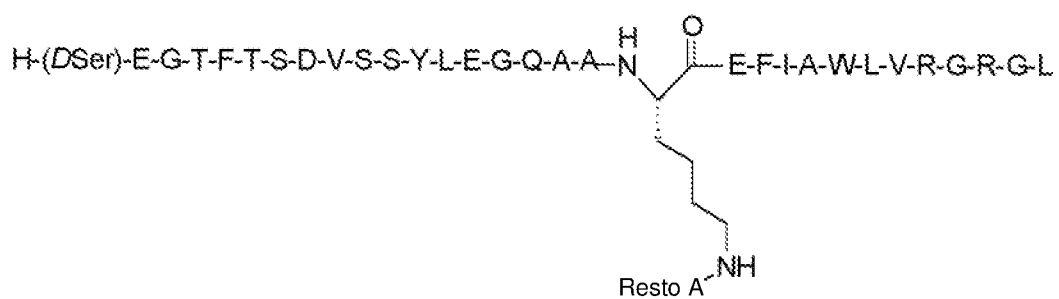
10 o  
(h)



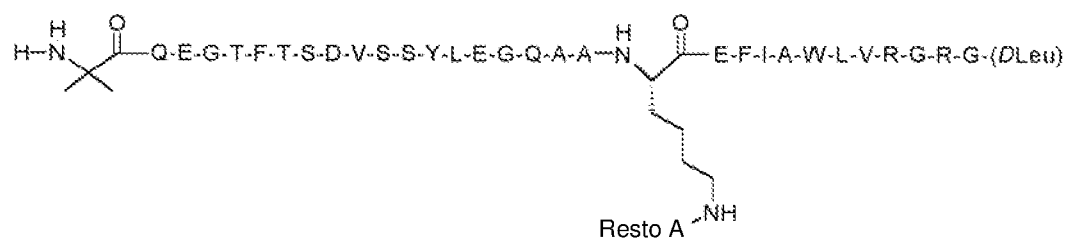
o  
(i)



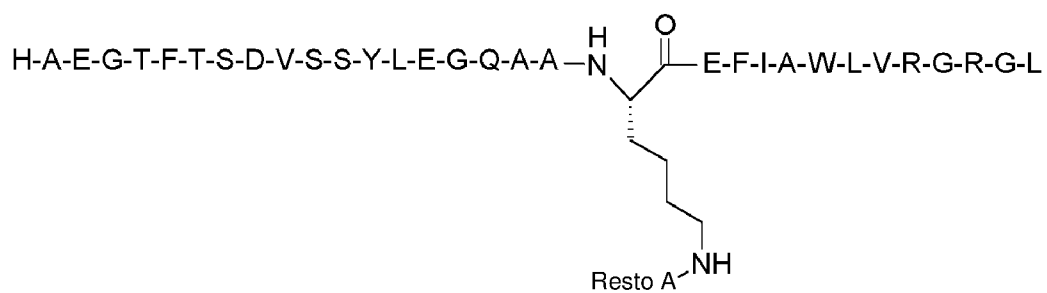
5 o  
j)



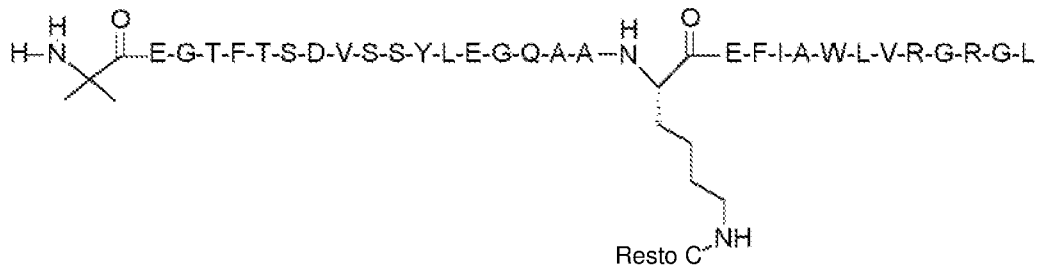
o  
(k)



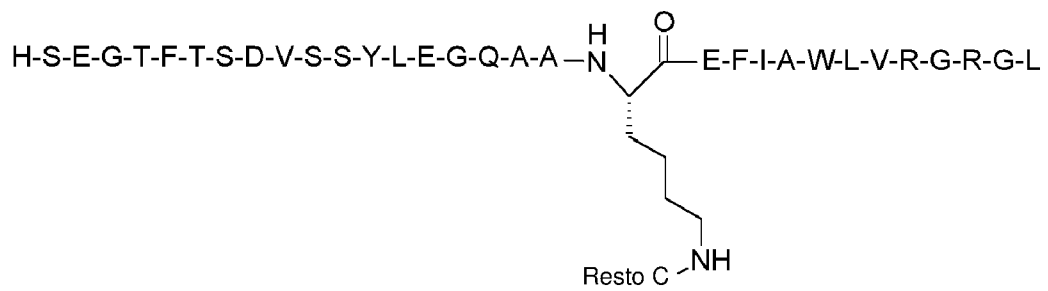
10 o  
(l)



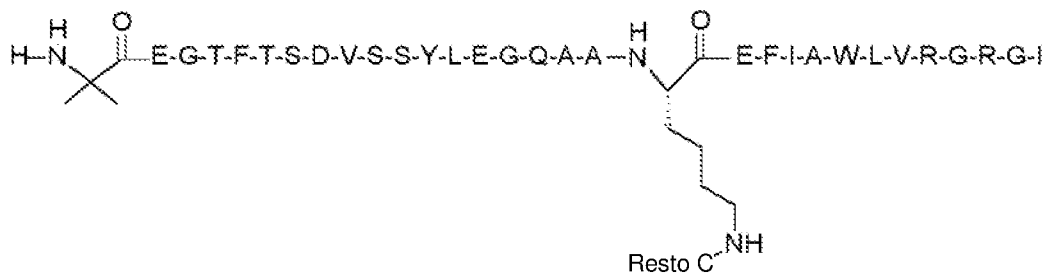
o  
(m)



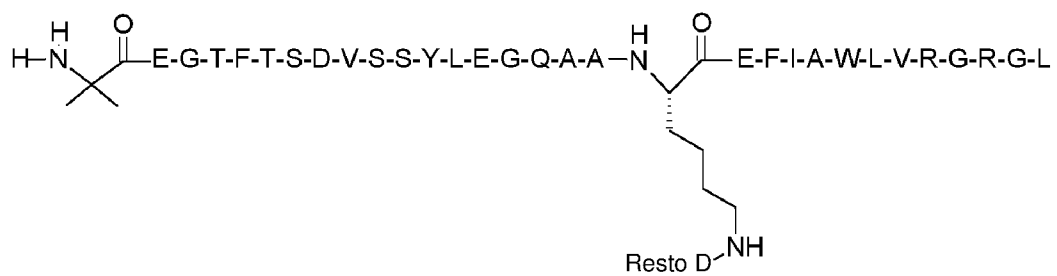
5 o  
(n)



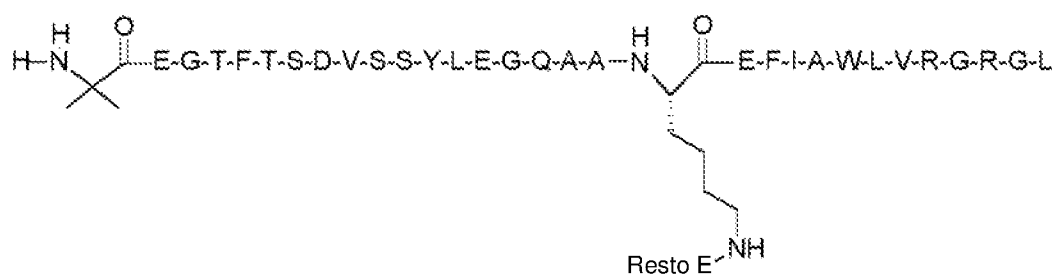
o  
(o)



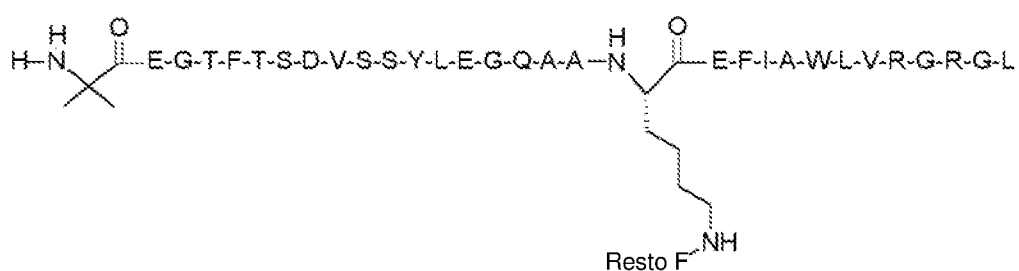
10 o  
(p)



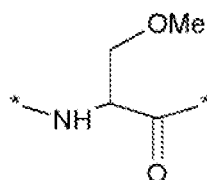
o  
(q)



5 o  
(r)

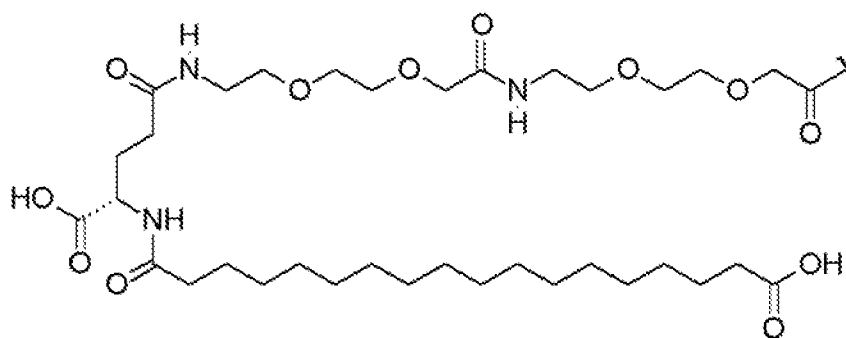


en donde D-Ser es un residuo de serina que tiene una configuración D y D-Leu es un residuo de leucina que tiene una configuración D;  
en donde Ser(OMe) es un residuo de serina que tiene la estructura:

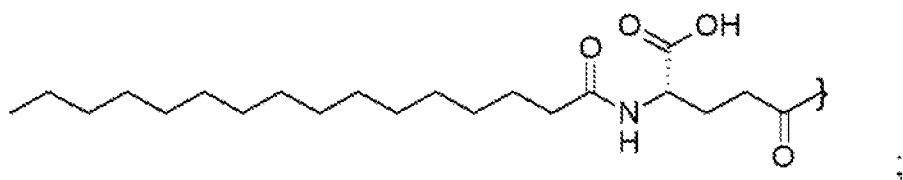


10

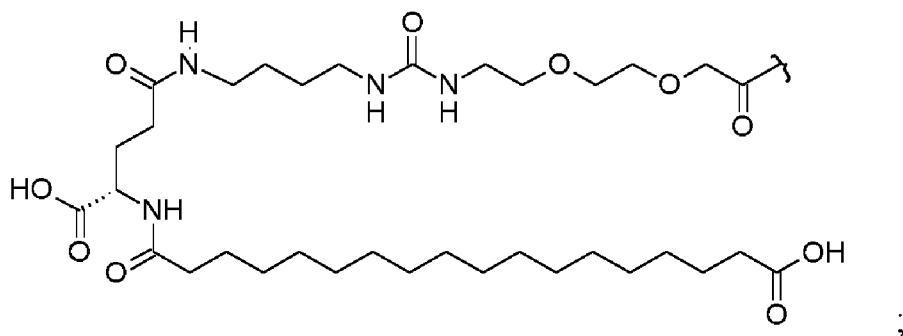
en donde el resto A tiene la estructura:



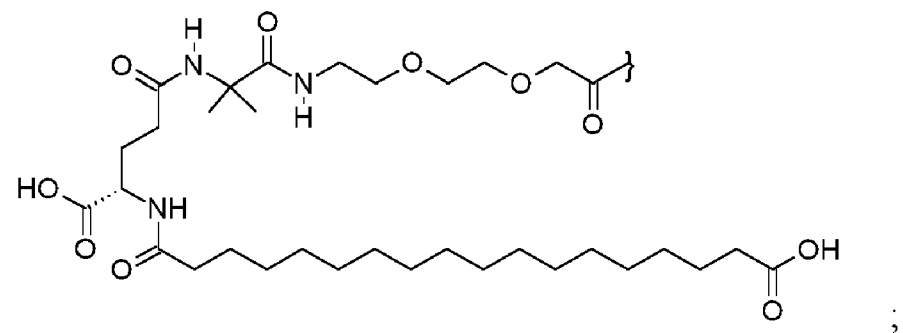
en donde el resto B tiene la estructura:



en donde el resto C tiene la estructura:

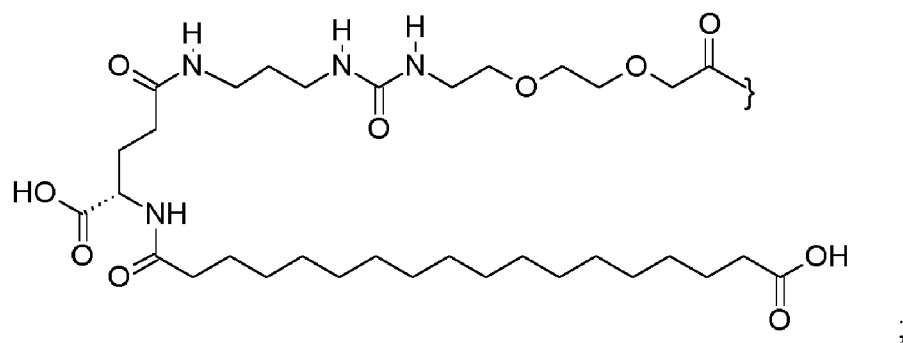


en donde el resto D tiene la estructura:



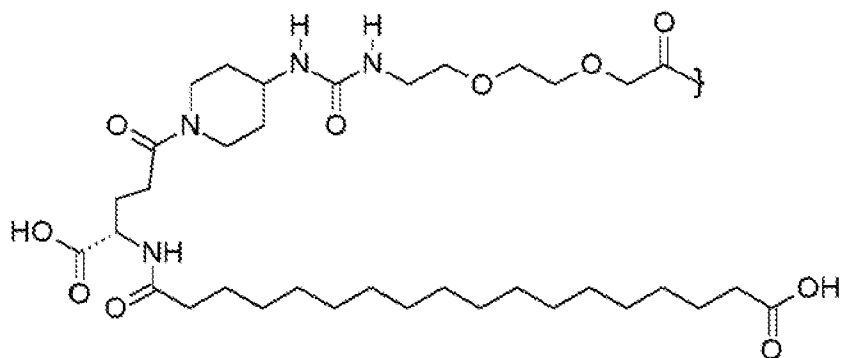
5

en donde el resto E tiene la estructura:

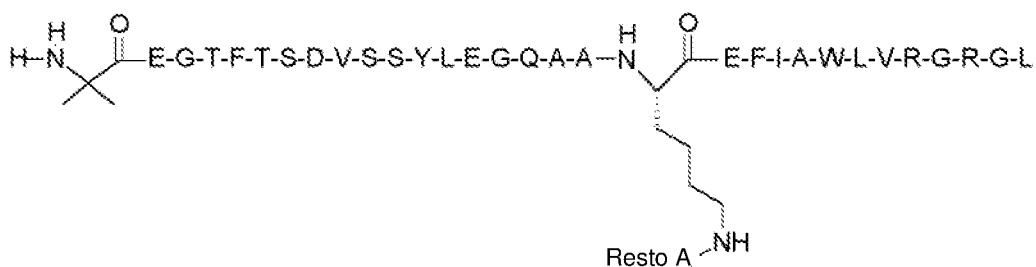


y

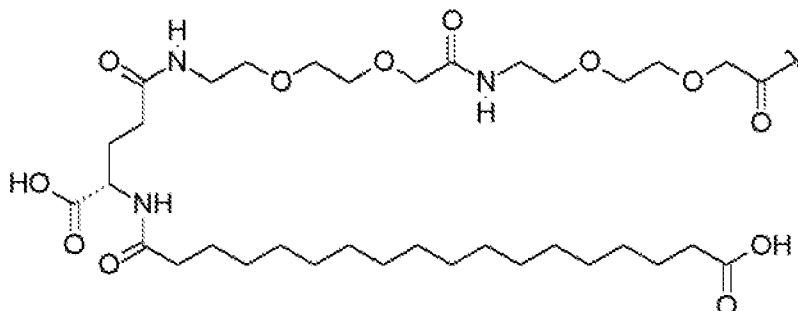
en donde el resto F tiene la estructura:



2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

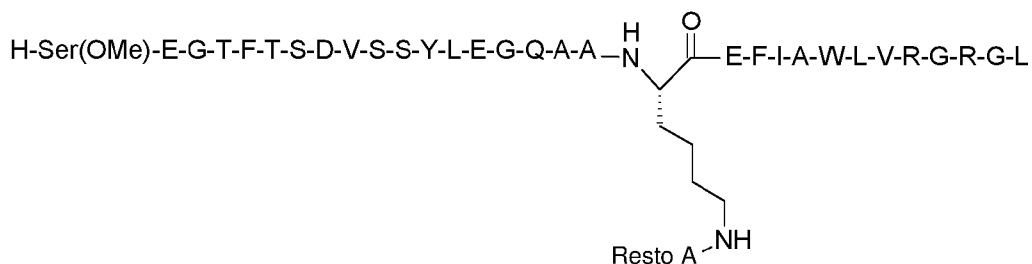


en donde el resto A tiene la estructura:

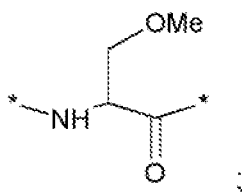


5

3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

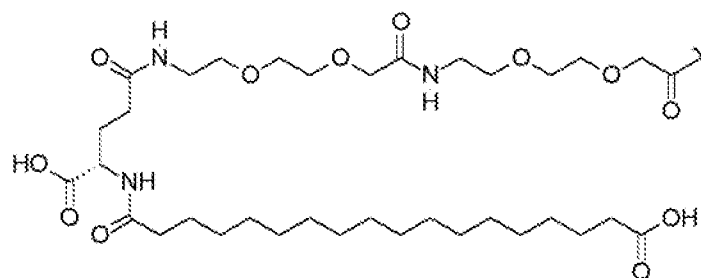


en donde Ser(OMe) es un residuo de serina que tiene la estructura:

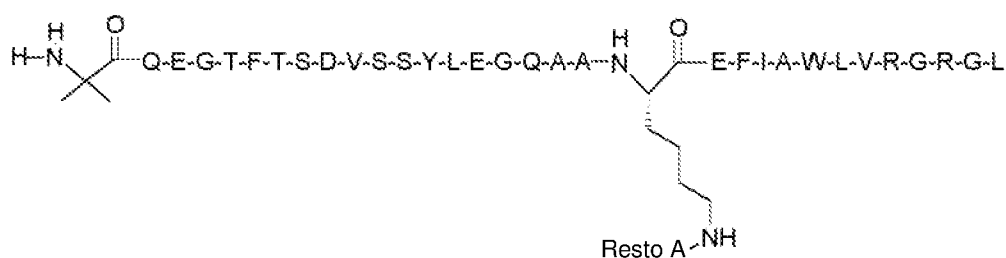


$y$ 

en donde el resto  $A$  tiene la estructura:

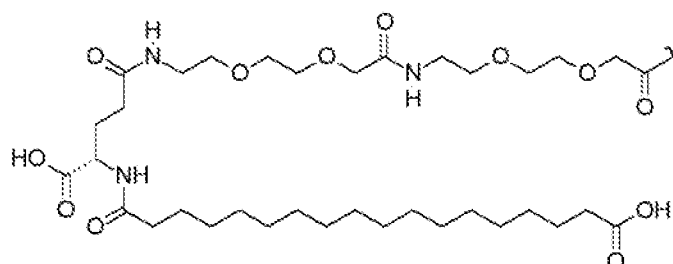


4. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

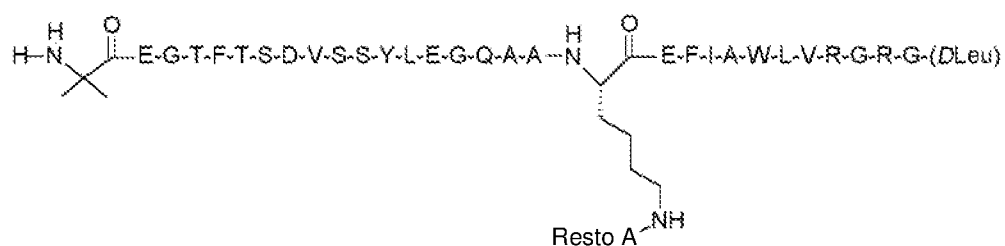


5

en donde el resto  $A$  tiene la estructura:

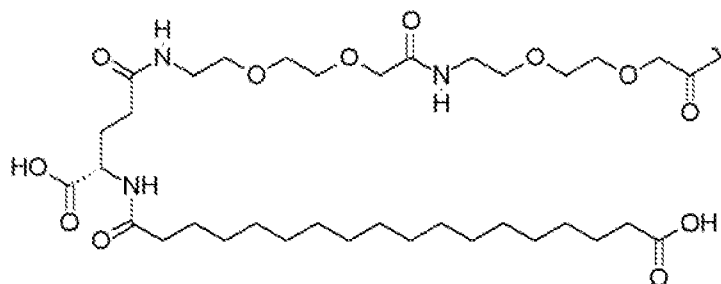


5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

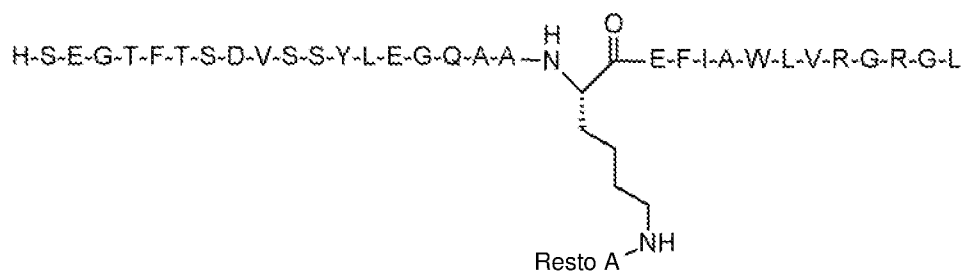


10

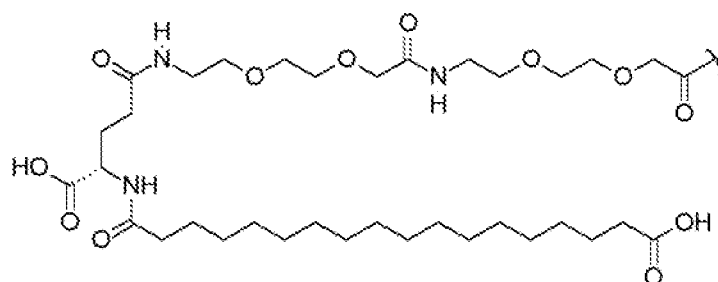
en donde DLeu es un residuo de leucina que tiene una configuración D; y  
en donde el resto A tiene la estructura:



6. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

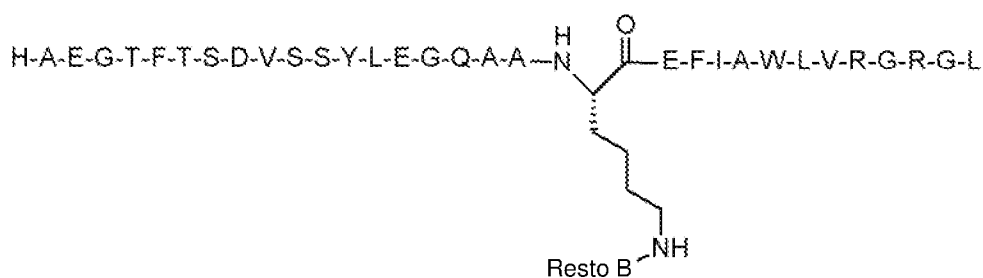


en donde el resto  $A$  tiene la estructura:

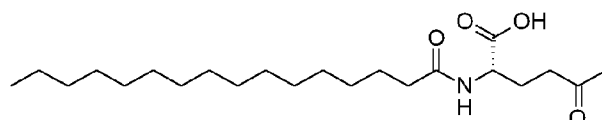


5

7. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

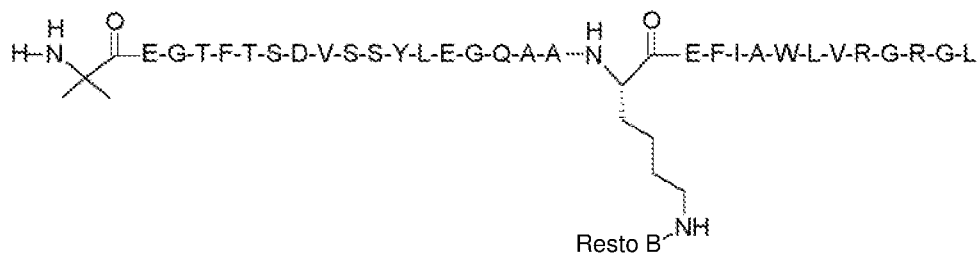


en donde el resto B tiene la estructura:

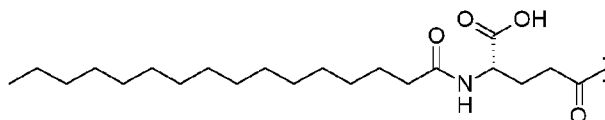


10 8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

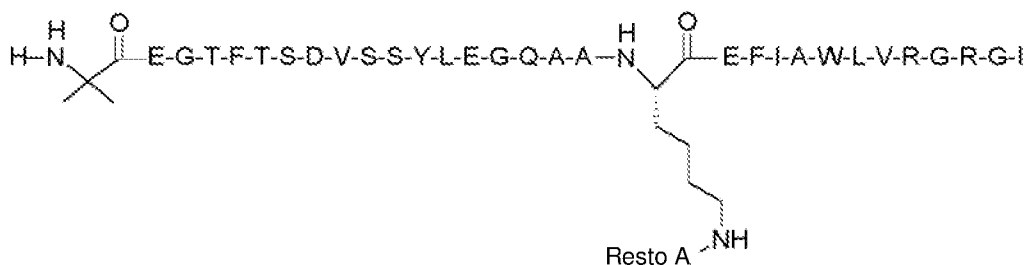




en donde el resto B tiene la estructura:

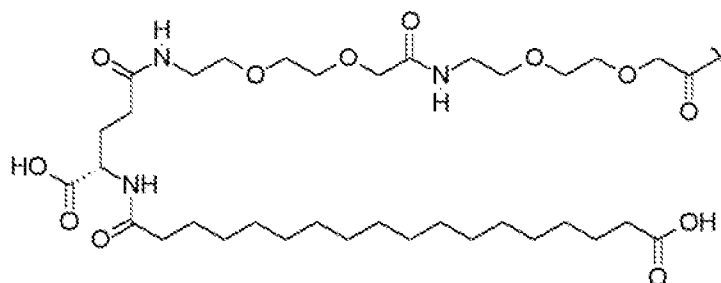


9. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

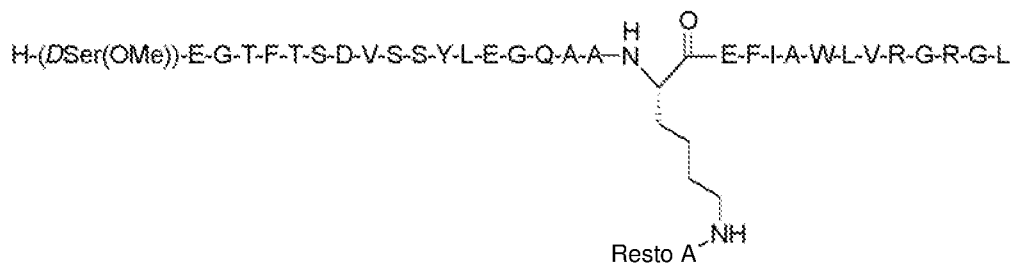


5

en donde el resto A tiene la estructura:

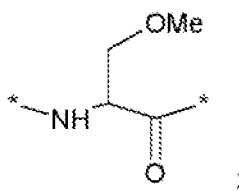


10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

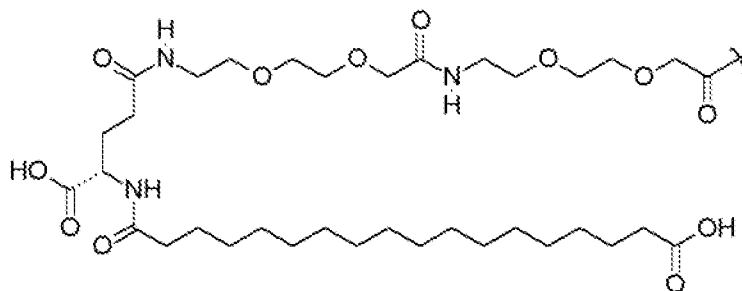


10

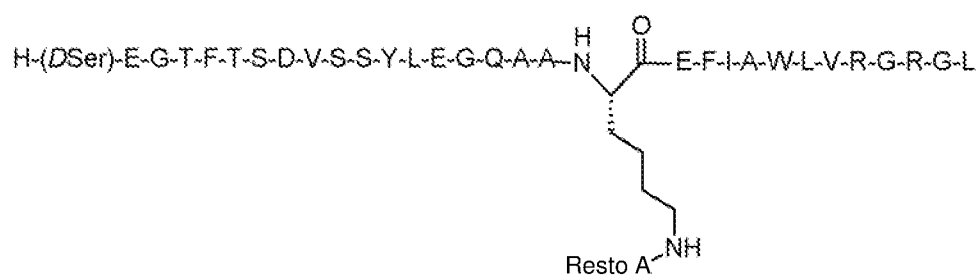
en donde *DSer* es un residuo de serina que tiene una configuración D y *DLeu* es un residuo de leucina que tiene una configuración D; en donde Ser(OMe) es un residuo de serina que tiene la estructura:

 $y$ 

en donde el resto  $A$  tiene la estructura:

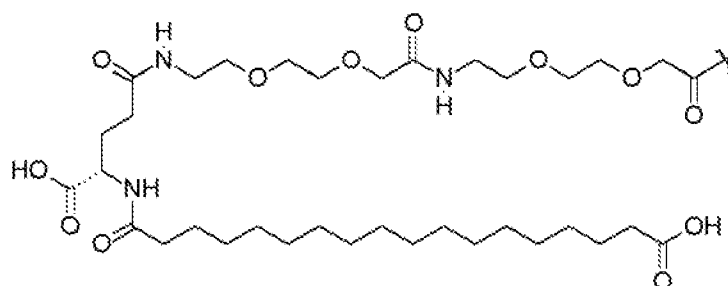


- 5 11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:



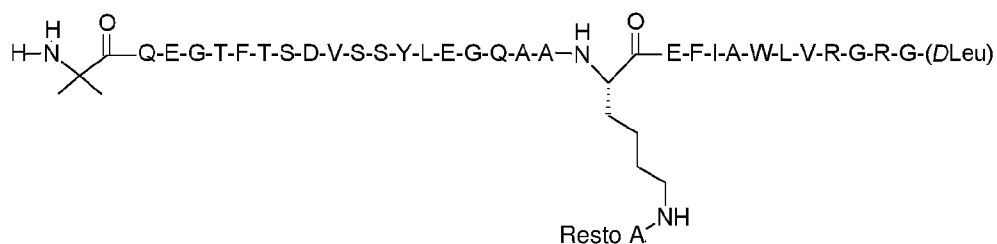
en donde *DSer* es un residuo de serina que tiene una configuración D; y

en donde el resto  $A$  tiene la estructura:

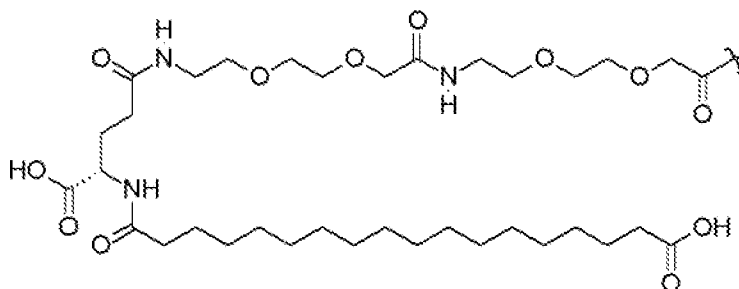


10

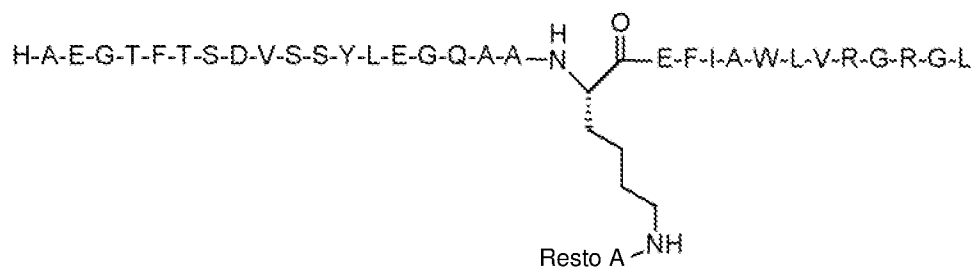
12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:



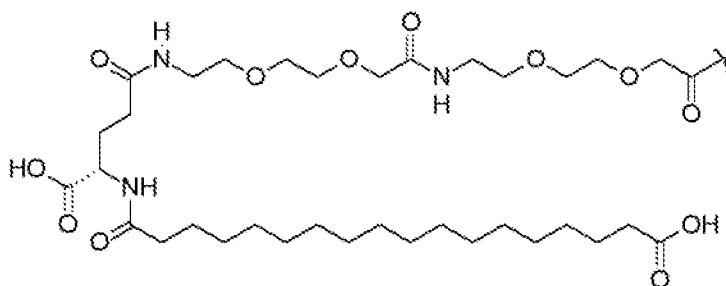
en donde DLeu es un residuo de leucina que tiene una configuración D; y  
en donde el resto A tiene la estructura:



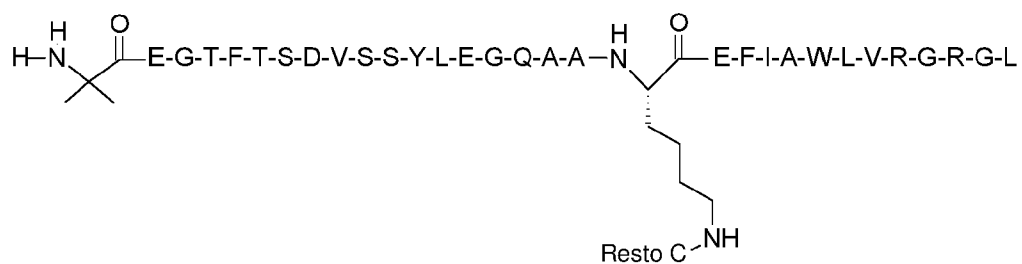
- 5 13. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:



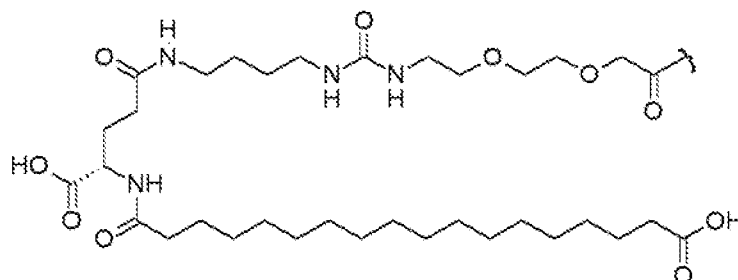
en donde el resto A tiene la estructura:



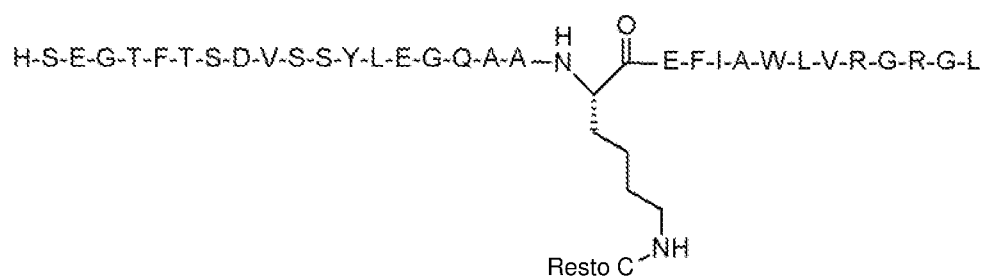
- 10 14. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:



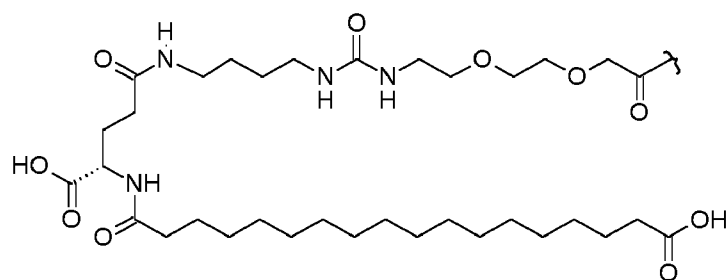
en donde el resto C tiene la estructura:



15. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:



en donde el resto C tiene la estructura:



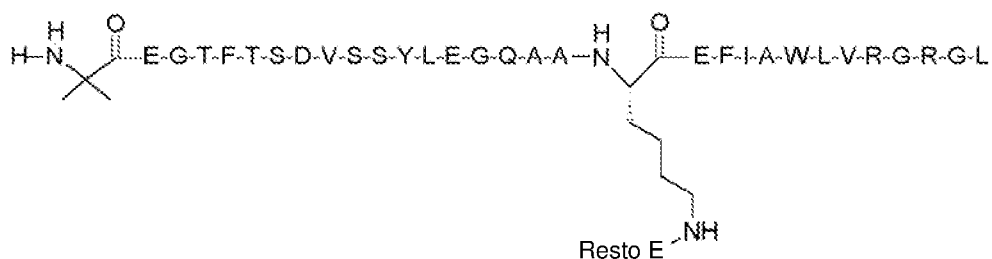
16. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:

CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)NC(C(=O)O)CC(=O)NCCCCNC(=O)NCCOCCOCC(=O)O

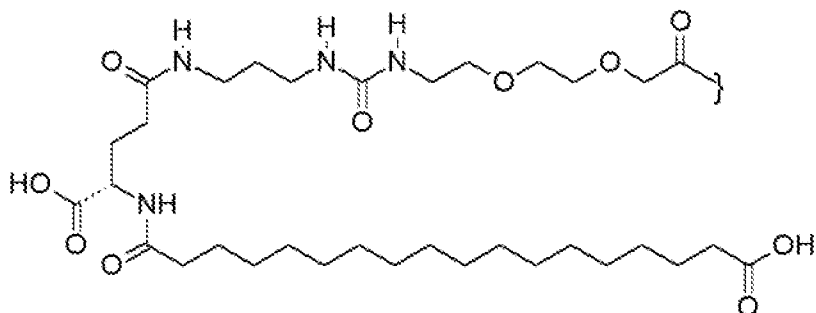
NC(C)(C)C(=O)E-G-T-F-T-S-D-V-S-S-Y-L-E-G-Q-A-A-N[C@@H](CCCCN)C(=O)E-F-I-A-W-L-V-R-G-R-G-L

CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)NC(CCC(=O)N)C(=O)N(C(C)(C)C)C(=O)OCCOCCOC(=O)O

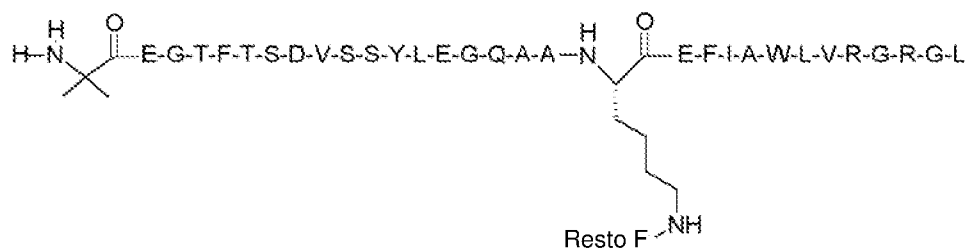
10



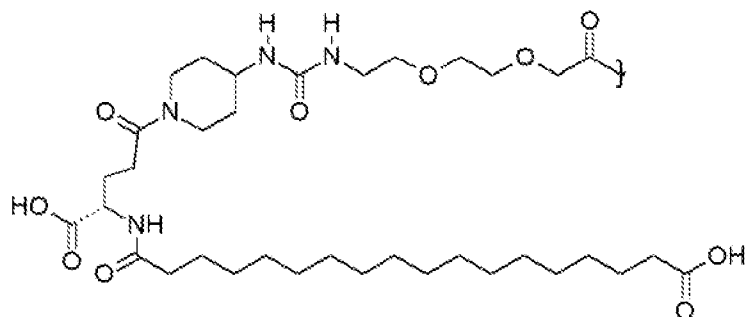
en donde el resto E tiene la estructura:



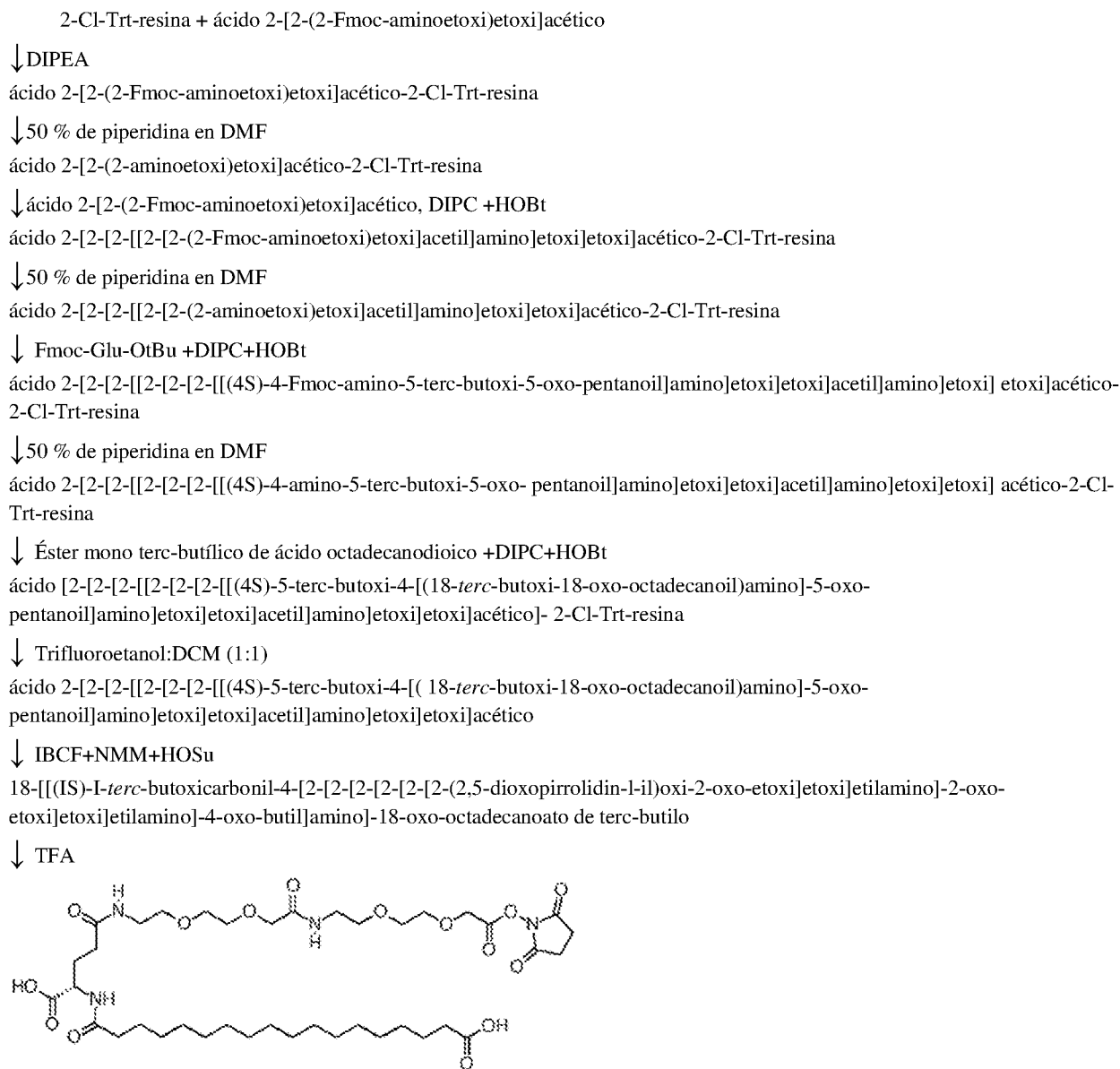
19. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia de aminoácidos:



en donde el resto F tiene la estructura:



20. El polipéptido de cualquier reivindicación anterior para su uso en el tratamiento de la diabetes.
21. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para su uso en el tratamiento de la obesidad.



Resto A-OSu

Figura 1A

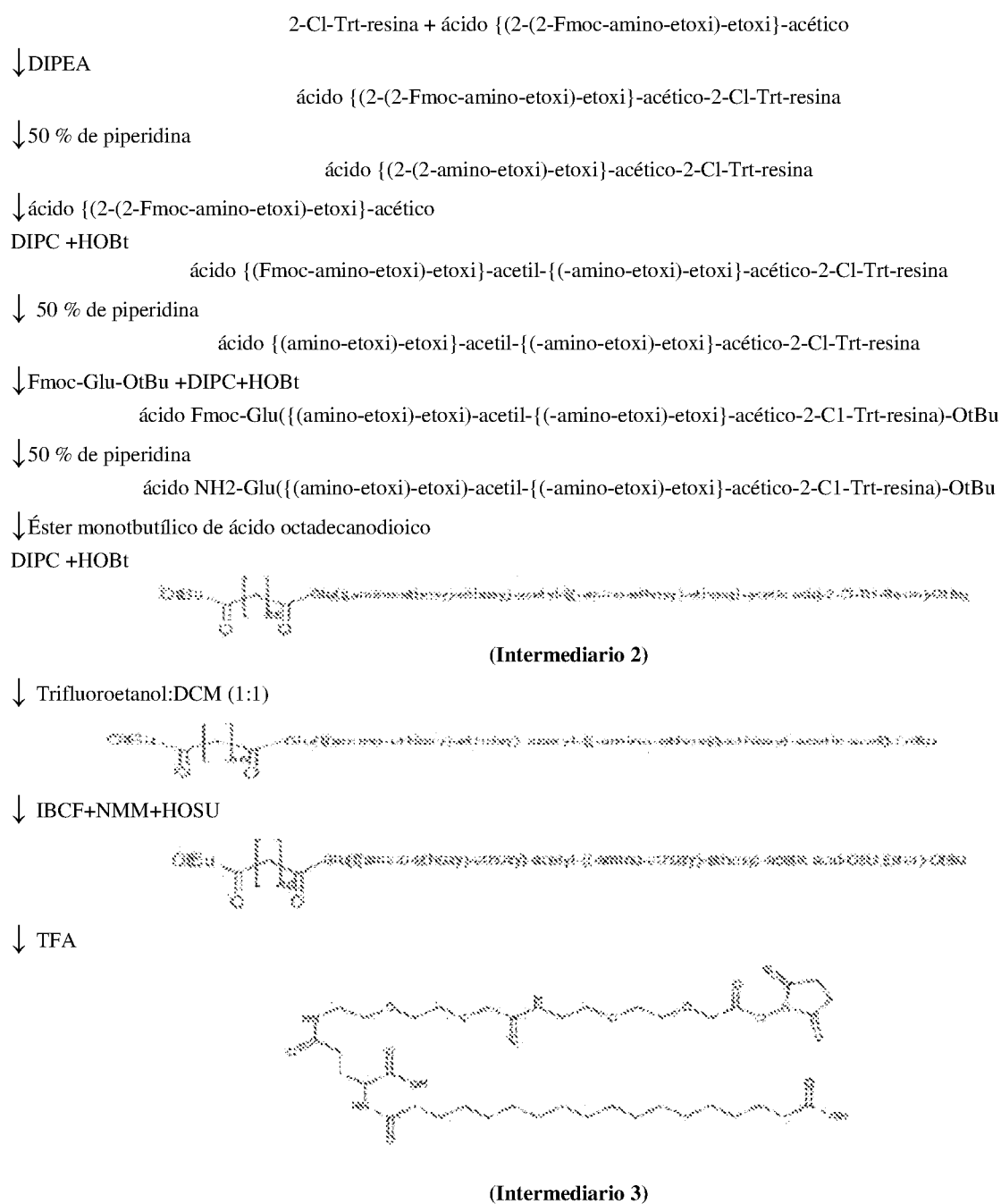


Figura 1B



2-Cl-Trt-resina + ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético

↓ DIPEA

ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Tn-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

ácido {2-(2-(2-amino-etoxi)-etoxi)-acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 4-nitrofenilcloroformiato + DIPEA

sal de clorhidrato de 4-Fmoc-amino butilamina

DIPC +HOBt

ácido 2-[2-[2-(4-Fmoc-aminobutylcarbamoylamino)etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trn-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

Fmoc-Glu-OtBu +DIPC+HOBt

ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)-4-Fmoc-amino-5-terc-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]butylcarbamoylamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

Éster mono *terc*-butílico de ácido octadecanodioico +DIPC+HOBt

ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]butylcarbamoylamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

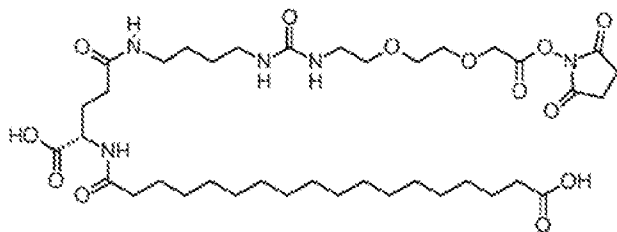
↓ Trifluoroetanol:DCM (1:1)

ácido 2-[2-[2-[4-[(4S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]butylcarbamoylamino]etoxi]etoxi]acético

↓ DCC+HOSu

18-[[[(1S)-1-terc-butoxicarbonil-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi] etilcarbamoylamino]butilamino]-4-oxo-butyl]amino]-18-oxo-octadecanoato de *terc*-butilo

↓ TFA



Resto C-OSu

Figura 2

2-Cl-Trt-resina + ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético

↓ DIPEA

ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

ácido 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ Fmoc-Aib-OH

DIPC +HOBt

ácido 2-[2-[2-[(2-Fmoc-amino-2-metil-propanoil)amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina

Fmoc-Glu-OtBu +DIPC+HOBt

ácido 2-[2-[2-[2-[[4S]-4-Fmoc-amino-5-*tert*-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]-2-metil-propanoil] amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

Éster mono *tert* butilo de ácido octadecanodioico +DIPC +HOBt

ácido 2-[2-[2-[2-[[4S]-5-*tert*-butoxi-4-[(18-*tert*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil] amino]-2-metil-propanoil]amino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

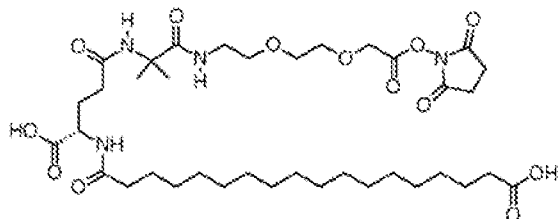
↓ Trifluoroetanol:DCM (1:1)

ácido 2-[2-[2-[2-[[4S]-5-*tert*-butoxi-4-[(18-*tert*-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil] amino]-2-metil-propanoil]amino]etoxi]etoxi]acético

↓ DCC+HOSu

18-[[[(1S)-1-*tert*-butoxicarbonil-4-[[2-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo- etoxi]etoxi]etilamino]-1,1-dimetil-2-oxo-etil]amino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de *tert*-butilo

↓ TFA



Resto D-OSu

Figura 3

2-Cl-Trt-resina + ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético

↓ DIPEA

ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

ácido 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 4-nitrofenilcloroformiato + DIPEA

1,3-diaminopropano +HOBt

Fmoc-Glu-OtBu +DIPC+HOBt

ácido 2-[2-[2-[3-[[4(S)-4-Fmoc-amino-5-terc-butoxi-5-oxo-pentanoil]amino]propilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

Éster mono *terc* butilo de ácido octadecanodioico +DIPC +HOBt

ácido 2-[2-[2-[3-[[4(S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]propilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

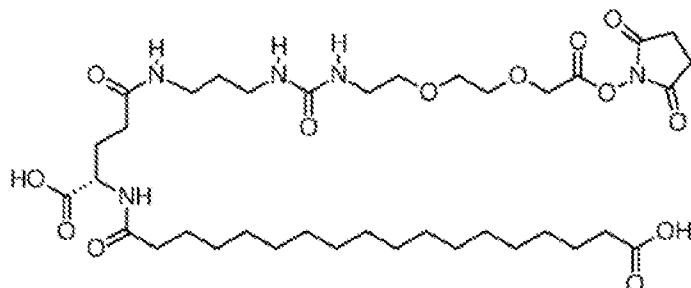
↓ Trifluoroetanol:DCM (1:1)

ácido 2-[2-[2-[3-[[4(S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]amino]propilcarbamoilamino]etoxi]etoxi]acético

↓ DCC+HOSu

18-[[1(S)-1-terc-butoxicarbonil-4-[3-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoilamino]propilamino]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de terc-butilo

↓ TFA



Resto D-OSu

Figura 4

2-Cl-Trt-resina + ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético

↓ DIPEA

ácido 2-[2-(2-Fmoc-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

ácido 2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 4-nitrofenilcloroformiato + DIPEA

4-amino-Boc-piperidina

DIPEA + HOBt

ácido (2-[2-[2-(4-Boc-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ TFA

ácido 2-[2-[2-(4-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético

↓ Fmoc-OSu, TEA

ácido 2-[2-[2-(4-Fmoc-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético + 2-Cl-Trt-resina

↓ DIPEA

ácido 2-[2-[2-(4-Fmoc-piperidilcarbamoilamino)etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

Fmoc-Glu-OtBu + DIPC + HOBt

ácido 2-[2-[2-[1-[1-(4S)-4-amino-5-terc-butoxi-5-oxo-pentanoil]-4-piperidil]carbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

↓ 50 % de piperidina en DMF

Éster mono *terc* butilo de ácido octadecanodioico + DIPC + HOBt

ácido 2-[2-[2-[1-[1-(4S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]-4-piperidil]carbamoilamino]etoxi]etoxi]acético-2-Cl-Trt-resina

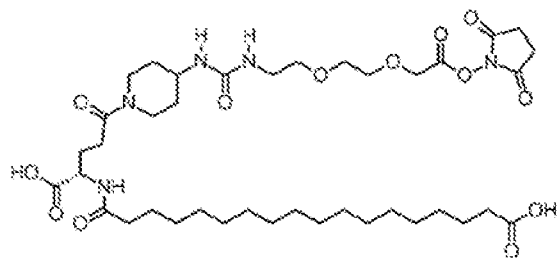
↓ Trifluoroetanol:DCM (1:1)

ácido 2-[2-[2-[1-[1-(4S)-5-terc-butoxi-4-[(18-terc-butoxi-18-oxo-octadecanoil)amino]-5-oxo-pentanoil]-4-piperidil]carbamoilamino]etoxi]etoxi]acético

↓ DCC + HOSu

18-[[[(1S)-1-terc-butoxicarbonil-4-[4-[2-[2-[2-(2,5-dioxopirrolidin-1-il)oxi-2-oxo-etoxi]etoxi]etilcarbamoilamino]-1-piperidil]-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoato de terc-butilo

↓ TFA



Resto F-OSu

Figura 5

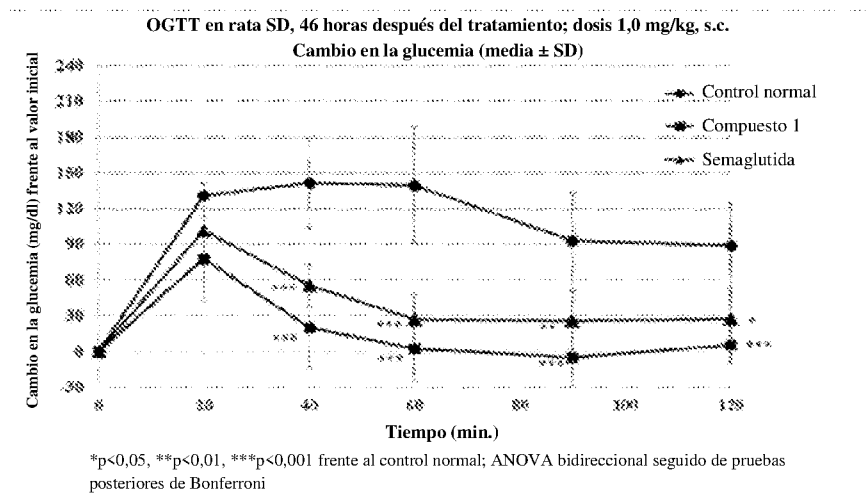


Figura 6 (A)

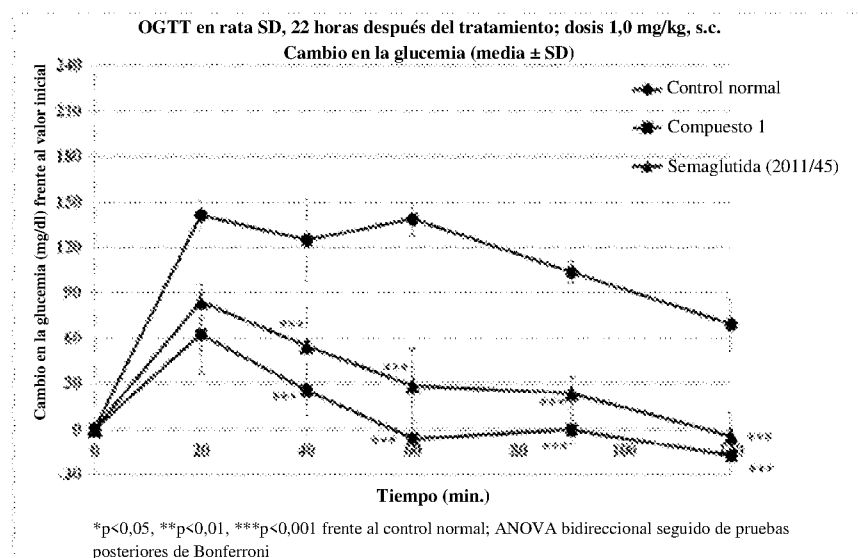
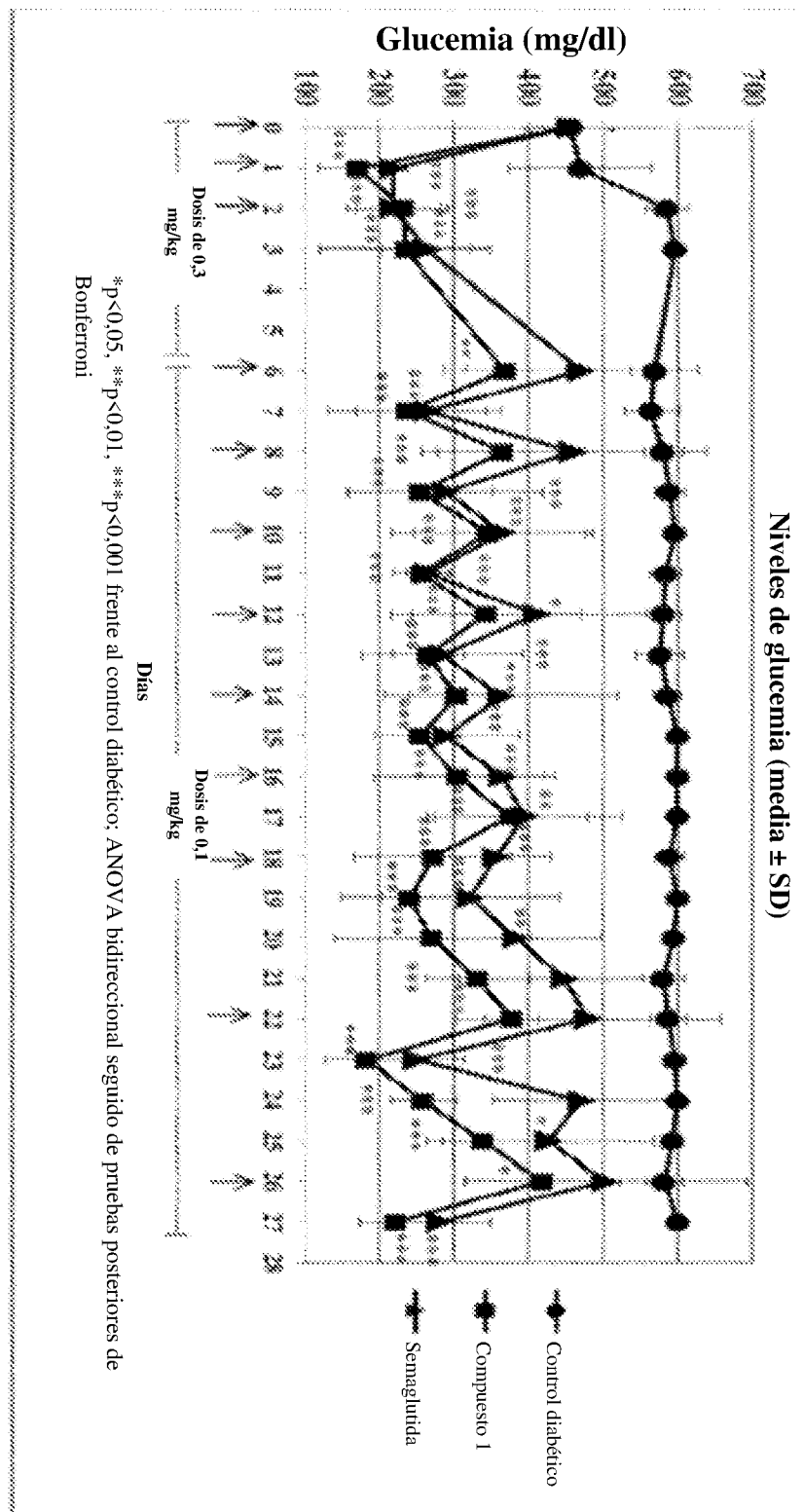
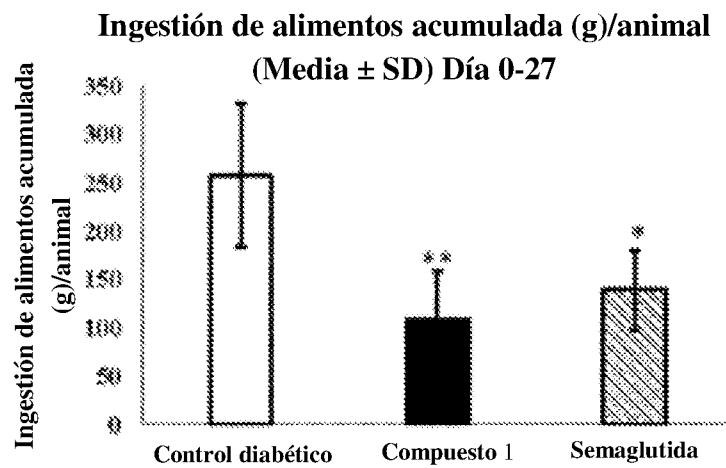


Figura 6 (B)



**Figura 7**



\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  frente al control diabético; ANOVA unidireccional seguido de pruebas posteriores de Bonnett

Figura 8

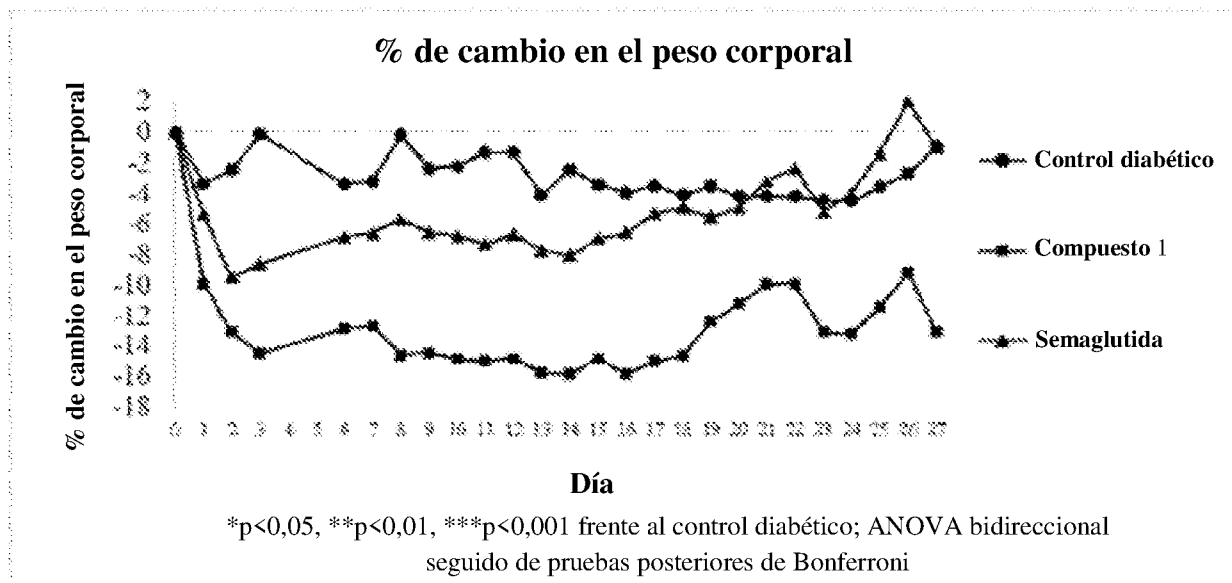


Figura 9



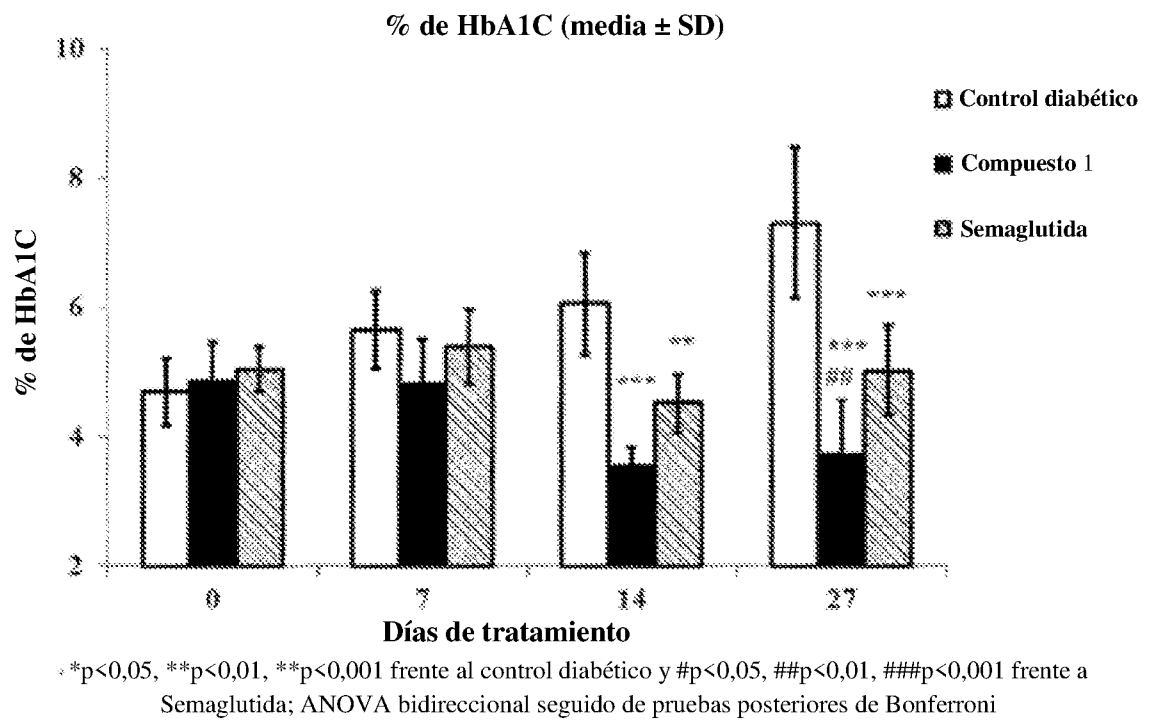


Figura 10