# COMPUESTOS CO-AGONISTAS DEL GLUCAGÓN Y PÉPTIDO-1 SIMILAR AL GLUGACÓN (GLP-1)

## CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención está en el campo de la medicina. Más particularmente, la presente invención está en el campo de tratamiento de diabetes y obesidad y se refiere a compuestos que agonizan tanto el receptor de glucagón (Gcg, por sus siglas en inglés) como el receptor del péptido-1 similar al glucagón (GLP-1 por sus siglas en inglés). Se proporcionan específicamente, análogos de oxintomodulina/glucagón con modificaciones de aminoácido introducidas para modular la actividad para tanto el receptor de Gcg como al receptor de GLP-1.

## ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Durante las pasadas varias décadas, la prevalencia de diabetes ha continuado elevándose. La diabetes mellitus Tipo 2 (T2D, por sus siglas en inglés) es la forma más común de diabetes representando aproximadamente 90% de toda la diabetes. La T2D es caracterizada por altos niveles de glucosa en sangre causados por la resistencia a la insulina. El estándar de cuidado actual para la T2D incluye dieta y ejercicio junto con fármacos de reducción de glucosa inyectable y oral disponibles. No obstante, muchos pacientes con T2D todavía permanecen inadecuadamente controlados. La

diabetes no controlada conduce a varias condiciones que impactan la morbidez y mortalidad de pacientes. La causa conducente de muerte para pacientes diabéticos son las complicaciones cardiovasculares. Uno de los principales factores de riesgo para la diabetes tipo 2 es la obesidad. La mayoría de los pacientes con T2D (~90%) son con sobrepeso u obesos. Está documentado que una reducción en la adiposidad del cuerpo conducirá a mejoramiento en las co-morbilidades asociadas con la obesidad que incluyen hiperglicemia y eventos cardiovasculares. Por lo tanto, las terapias efectivas en el control de glucosa y reducción de peso son necesarias para el mejor manejo de la enfermedad.

Un número de péptidos derivados del pre-proglucagón, y análogos de los mismos, han sido propuestos como terapéuticos para el tratamiento de T2D y obesidad, en particular, Gcg, GLP-1 y oxintomodulina (OXM, por sus siglas en inglés). El pre-proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que es procesado de manera diferencial en el tejido para formar un número de péptidos derivados del proglucagón estructuralmente relacionados, que incluyen Gcg, GLP-1, péptido-2 similar al glucagón (GLP-2, por sus siglas en inglés), y oxintomodulina (OXM). Estas moléculas están involucradas en una amplia variedad de funciones fisiológicas, que incluyen homeostasis de glucosa, secreción de insulina, vacío gástrico y crecimiento intestinal, así

como también regulación de la absorción de alimento.

El Gcg es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del preproglucagón. La OXM es un péptido de 37 aminoácidos y está compuesto de la secuencia completa de 29 aminoácidos de Gcg con una extensión carboxi terminal octapeptídica (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón y llamado "péptido 1 de intervención" o IP-1). El principal fragmento biológicamente activo de GLP-1 ($GLP\text{-}1_{7\text{-}36}$) se produce como un péptido amidado C-terminal, de 30 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 de pre-proglucagón.

El Gcg ayuda a mantener el nivel de glucosa en la sangre por unión a los receptores de Gcg en hepatocitos, causando que el hígado libere glucosa -almacenada en la forma de glicógeno- a través de la glicogenólisis. Como estos almacenes llegan a agotarse, el Gcg estimula al hígado para sintetizar glucosa adicional por gluconeogénesis. Esta glucosa es liberada en la corriente sanguínea, previniendo el desarrollo de hipoglicemia.

El GLP-1 tiene diferentes actividades biológicas comparadas con el Gcg. Sus acciones incluyen estimulación de las síntesis de insulina y secreción, inhibición de la secreción de Gcg e inhibición de la absorción de alimento. El GLP-1 ha sido mostrado por reducir la hiperglicemia en diabéticos. Varios antagonistas de GLP-1 han sido aprobados

para uso en el tratamiento de T2D en humanos, que incluyen exenátida, liraglutida, lixisenátida, albiglutida y dulaglutida. Tales agonistas de GLP-1 son efectivos en el control glicémico con efectos favorables en el peso sin el riesgo de hipoglicemia. Sin embargo, la pérdida de peso es modesta debido a los efectos secundarios gastrointestinales dependientes de la dosis.

La OXM es liberada junto con GLP-1 de las células-L del intestino delgado en proporción a la ingestión de nutriente. La OXM activa tanto los receptores de Gcg como GLP-1, con una potencia ligeramente superior para el receptor de Gcg sobre el receptor de GLP-1. Es menos potente que el Gcg nativo y GLP-1 en sus receptores respectivos. La Gcg humana es también capaz de activar ambos receptores, aunque con una fuerte preferencia para el receptor de Gcg sobre el receptor de GLP-1. El GLP-1 no es capaz de activar los receptores de Gcg. La OXM está involucrada en la regulación de la absorción de alimento y peso corporal. Se ha mostrado por suprimir el apetito e inhibir la absorción de alimento en humanos. En un estudio de 4 semanas con sujetos con sobrepeso y obesos, la administración subcutánea preprandial tres veces al día diariamente de OXM produce una pérdida de peso de 2.3 kg comparado con 0.5 kg en el grupo de placebo. En este ensayo, las náuseas, el efecto secundario más común asociado con la terapia a base de GLP-1 (tal como exenátida y

liraglutida), fue menos frecuente. En otro estudio más corto, la OXM se mostró por reducir la absorción calórica e incrementar el gasto de energía relacionado con la actividad en sujetos con sobrepeso y obesos.

Estos datos sugieren que la OXM tiene el potencial de ser un agente anti-diabetes/obesidad bien tolerado. La OXM, sin embargo, presenta varios desafíos para el desarrollo en un agente terapéutico comercialmente disponible. La OXM endógena es rápidamente degradada *in vivo* por dipeptidil peptidasa IV y otras peptidasas, así como también son sometidas a rápida separación renal debido a su tamaño pequeño. Por lo tanto, es deseable identificar péptidos que activan los receptores de Gcg y GLP-1 con estabilidad metabólica mejorada y velocidad de separación reducida.

Los péptidos de OXM con sustituciones de aminoácido para mejorar la estabilidad y con modificaciones adicionales para separación lenta, tales como PEGilación o lipidación, son descritos en la técnica. Otros péptidos han sido declarados por unirse a, y activar tanto el receptor de Gcg como el receptor de GLP-1 y para suprimir la ganancia de peso corporal (véase, por ejemplo, documentos WO 2011/075393 A2 y WO 2012/177444 A2).

Debido a la disponibilidad de varios péptidos que agonizan tanto a los receptores de Gcg como GLP-1, permanece una necesidad de compuestos más potentes, estables, de acción

prolongada, y/o bien tolerados que tienen una relación de actividad de receptor de Gcg (Gcg-R)/receptor de GLP-1 (GLP-1-R) que ha sido bien optimizada de manera que la potencia y actividad insulinotrópica de los compuestos proporciona tratamientos efectivos para la diabetes, preferiblemente T2D, y trastornos relacionados. En particular, permanece una necesidad de compuestos con una relación equilibrada de actividad de coagonista de Gcg-R/GLP-1-R que reduce el peso corporal. También, permanece una necesidad para proporcionar compuestos con una relación equilibrada de actividad de co-agonista de Gcg-R/GLP-1-R que soporta el potencial de dosificación diaria, dos veces por semana, una vez por semana o mensualmente. Por consiguiente, la presente invención parece proporcionar tratamientos efectivos para la diabetes, obesidad, enfermedad de hígado graso no alcohólica (NAFLD, pos sus siglas en inglés) y/o esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés).

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

En un aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde

Xaa2 es Aib;

Xaa28 es Glu o Ser;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 2),

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde

Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 3),

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En aún otro aspecto, la presente invención

proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde

Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 4),

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, la Lys en la posición 20 es químicamente modificada por conjugación con un ácido graso C14-C24 mediante un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24.

Preferiblemente, además, el enlazador se selecciona a partir del grupo que consiste de:

(a) un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I:

$$H-\{NH-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_m-O-(CH_2)_p-CO\}_n-OH \quad (I)$$

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12, y p es 1 o 2;

(b) un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de arginina (Arg), asparagina (Asn), ácido aspártico (Asp), glutamina (Gln), ácido glutámico (Glu), histidina (His), lisina (Lys), serina (Ser), treonina (Thr), citrulina (Cit), ornitina (Orn), sarcosina (Sar), glicina (Gly), ácido γ-aminobutírico (γ-Abu) y ácido γ-glutámico (γ-Glu);

(c) un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico;

(d) un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu y γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu;

(e) un polipéptido seleccionado a partir del grupo

que consiste de $(Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_q$ $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$ y $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$, $(\text{ácido 6-aminohexanoico})_s$, $(\text{ácido 5-aminovalérico})_s$, $(\text{ácido 7-aminoheptanoico})_s$, y $(\text{ácido 8-aminoheptanoico})_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15; y

(f) un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I como se define en (a) es conjugado con:

(i) un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu;

(ii) un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico;

(iii) un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu y γ-Abu-γ-Abu-γ-

Abu; o

(iv) un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de $(Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_q$ $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$ y $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$, $(\text{ácido 6-aminohexanoico})_s$, $(\text{ácido 5-aminovalérico})_s$, $(\text{ácido 7-aminoheptanoico})_s$, y $(\text{ácido 8-aminoheptanoico})_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15.

En un aspecto preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el enlazador es un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I:

$$H\text{-}\{NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}[O\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_m\text{-}O\text{-}(CH_2)_p\text{-}CO\}_n\text{-}OH \qquad (I)$$

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12, y p es 1 o 2.

Preferiblemente, n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6 y m es 1 y p es 1 para el carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I.

Preferiblemente, además, n es 2, m es 1 y p es 1 para el carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I.

En un aspecto preferido adicional de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el enlazador es un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de Arg, Asn,

Asp, Gln, Glu, His, Lys, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu.

Preferiblemente, el aminoácido es γ-Glu.

En un aspecto todavía adicional preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el enlazador es un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico.

Preferiblemente, el dipéptido es γ-Glu-γ-Glu.

En un aspecto todavía adicional preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el enlazador es un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu y γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu.

En un aspecto todavía adicional preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos

farmacéuticamente aceptables, el enlazador es un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de $(Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_q$ $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$ y $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$, (ácido 6-aminohexanoico)$_s$, (ácido 5-aminovalérico)$_s$, (ácido 7-aminoheptanoico)$_s$, y (ácido 8-aminoheptanoico)$_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15.

En un aspecto todavía adicional preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el enlazador es un enlazador conjugado, en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I:

$$H\text{-}\{NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}[O\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_m\text{-}O\text{-}(CH_2)_p\text{-}CO\}_n\text{-}OH$$

(I)

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12, y p es 1 o 2,

es conjugado con:

(i) un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu;

(ii) un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-

Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico;

(iii) un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu y γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu; o

(iv) un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de $(Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_q$ $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$ y $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$, $(\text{ácido 6-aminohexanoico})_s$, $(\text{ácido 5-aminovalérico})_s$, $(\text{ácido 7-aminoheptanoico})_s$, y $(\text{ácido 8-aminoheptanoico})_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15.

Preferiblemente, n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6 y m es 1 y p es 1 para carboxilato de aminopolietilenglicol de Fórmula I.

Preferiblemente, además, n es 2, m es 1 y p es 1 para el carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I.

Todavía preferiblemente, además, el aminoácido es γ-Glu.

Todavía preferiblemente, además, el dipéptido es γ-Glu-γ-Glu.

En un aspecto preferido de los compuestos de la presente invención, el enlazador es ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_t$, en donde t es 1 o 2.

Preferiblemente, t es 1.

Preferiblemente, además, t es 2.

En un aspecto todavía adicional preferido de los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el ácido graso C14-C24 es un monoácido saturado o un diácido saturado.

Preferiblemente, el ácido graso es un monoácido saturado o diácido saturado seleccionado a partir del grupo que consiste de ácido mirístico (ácido tetradecanoico)(monoácido C14), ácido tetradecandioico (diácido C14), ácido palmítico (ácido hexadecanoico)(monoácido C16), ácido hexadecandioico (diácido C16), ácido margárico (ácido heptadecanoico)(monoácido C17), ácido heptadecandioico (diácido C17), ácido esteárico (ácido octadecanoico)(monoácido C18), ácido octadecandioico (diácido C18), ácido nonadecílico (ácido nonadecanoico)(monoácido C19), ácido nonadecandioico (diácido C19), ácido aracádico (ácido eicosanoico)(monoácido C20), ácido eicosandioico (diácido C20), ácido heneicosílico (ácido heneicosanoico)(monoácido C21), ácido heneicosandioico

(diácido C21), ácido behénico (ácido docosanoico)(C22), ácido docosandioico (diácido C22), ácido lignocérico (ácido tetracosanoico)(monoácido C24) y ácido tetracosandioico (diácido C24).

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido mirístico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido tetradecandioico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido palmítico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido hexadecandioico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido esteárico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido octadecandioico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido nonadecandioico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido aracádico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido eicosandioico.

Todavía preferiblemente, además, el ácido graso C14-C24 es ácido docosandioico.

En un aspecto todavía adicional preferido de los

compuestos de la presente invención, o sales de los mismos farmacéuticamente aceptables, el aminoácido C-terminal es amidado.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)_{16}CO_2H$; y

el aminoácido C-terminal es amidado (SEQ ID NO: 5), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)_{18}CO_2H$; y

el aminoácido C-terminal es amidado (SEQ ID NO: 6); o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_2$-CO-(CH$_2$)$_{16}$CO$_2$H; y

el aminoácido C-terminal es amidado (SEQ ID NO: 7); o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_2$-CO-(CH$_2$)$_{18}$CO$_2$H; y

el aminoácido C-terminal es amidado (SEQ ID NO: 8);

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y un portador, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, junto con un portador, diluyente, o excipiente farmacéuticamente aceptable y otros ingredientes terapéuticos.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes tipo 2 en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un método para tratar obesidad en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un método para tratar enfermedad del

hígado graso no alcohólica (NAFLD, por sus siglas en inglés) en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un método para tratar esteatohepatitis no alcohólica (NASH, por sus siglas en inglés) en un sujeto en necesidad del mismo, que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un método para inducir pérdida de peso no terapéutica en un sujeto que comprende la administración de una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en terapia.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de diabetes tipo 2.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de obesidad.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD).

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes tipo 2.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de obesidad.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de enfermedad del hígado graso no alcohólica (NAFLD).

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona el uso de un compuesto de la presente invención para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de esteatohepatitis no alcohólica (NASH).

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto intermediario de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib;

Xaa28 es Glu o Ser (SEQ ID NO: 9); y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado,

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, la presente invención proporciona un compuesto intermediario de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 10);

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

Preferiblemente, además, la presente invención proporciona un compuesto intermediario de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 11),

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un proceso para la manufactura de un compuesto de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa 2 es Aib; y

Xaa28 es Glu o Ser;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 2), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, tal proceso comprende la etapa de:

(i) modificar un compuesto intermediario de la siguiente fórmula:

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

en donde Xaa2 es Aib;

Xaa28 es Glu o Ser; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 9),

conjugando el grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys en la posición 20 del compuesto intermediario con un ácido graso C14-C24, opcionalmente mediante un enlazador.

Preferiblemente, la Lys en la posición 20 del compuesto intermediario es modificado por conjugación con un ácido graso C14-C24 mediante un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24.

En un aspecto todavía adicional, la presente invención proporciona un compuesto producido por el proceso descrito anteriormente.

Los compuestos de la presente invención son capaces de unirse a, y activar tanto el receptor de GLP-1 como el receptor de Gcg. Los compuestos de la presente invención son capaces de causar una reducción en la absorción de alimento en sujetos con sobrepeso y obesos. Los compuestos de la invención tienen potencial para producir efecto de pérdida de peso superior *contra* la OXM humana de tipo silvestre.

Los compuestos de la invención pueden proporcionar tolerancia mejorada a la glucosa y perfil lípido en sujetos con T2D y/o alteraciones metabólicas relacionadas y pueden hacerlo así más efectivamente que la OXM humana de tipo

silvestre.

Una ventaja particular de los compuestos de la presente invención es que la frecuencia de los efectos secundarios, tales como náuseas, la cual está comúnmente asociada con terapia de GLP-1, tal como exenátida y liraglutida, puede ser reducida o eliminada. Los compuestos de la presente invención de este modo pueden tener efectos secundarios reducidos comparados con terapia de GLP-1.

Los compuestos de la presente invención comprenden un polipéptido conjugado a un ácido graso. Los ácidos grasos, a través de sus porciones que se unen a albúmina, pueden mejorar las farmacocinéticas de un péptido extendiendo la vida útil en plasma y reduciendo la velocidad de separación. Mientras podría esperarse que los compuestos de la presente invención presenten un perfil de farmacocinética mejorado con relación a la OXM humana de tipo silvestre, la magnitud del mejoramiento no res predecible. Los inventores han descubierto que la longitud, composición y posición del ácido graso, y opcionalmente, el enlazador en los compuestos de la presente invención, resulta en compuestos con un perfil de farmacocinética deseable que soporta la dosificación diaria, dos veces a la semana, una vez a la semana o mensualmente.

Además del perfil de farmacocinética mejorado, los presentes inventores también han descubierto que la longitud, composición y posición del ácido graso, y opcionalmente, el

enlazador, son críticos a la optimización de la relación de la actividad co-agonista del Gcg-R/GLP-1-R.

La OXM humana de tipo silvestre tiene completa eficacia y potencia en el GLP-1-R humano y Gcg-R humano. La secuencia de aminoácido de la OXM humana de tipo silvestre se proporciona abajo:

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEQ ID NO: 1)

Ciertos compuestos de la presente invención tienen una relación equilibrada de actividad co-agonista del Gcg-R/GLP-1-R. Actividad equilibrada de Gcg y GLP-1 como se usa en la presente, se refiere a un compuesto que tiene una afinidad para receptores de Gcg y GLP-1 en un ensayo de unión *in vitro* que es cercano a 1:1, tal como 1:1 GLP-1/Gcg, 2:1 GLP-1/Gcg, 3:2 GLP-1/Gcg, 1:2 GLP-1/Gcg, o 2:3 GLP-1/Gcg. La búsqueda realizada por los inventores reveló que la longitud, composición y posición del ácido graso son críticos para lograr la relación equilibrada de actividad co-agonista de Gcg-R/GLP-1-R que es una característica de los compuestos de la presente invención, así como también de impactar la vida útil en plasma, estabilidad física, solubilidad y estabilidad *in vivo* de los compuestos de la presente invención.

Mientras la conjugación de un péptido con un ácido graso tiene ventajas con respecto a un perfil de

farmacocinética mejorada y/o relación equilibrada de actividad co-agonista de Gcg-R/GLP-1-R, podría esperarse también que el compuesto pueda perder actividad ya que existe potencial para interferencia con la interfaz de unión de ya sea el receptor de Gcg receptor o el receptor de GLP-1. Se ha encontrado, sin embargo, que la conjugación del residuo de Lisina en la posición 20 con un ácido graso retiene la actividad *in vitro* e *in vivo* en ambos receptores a una mayor extensión que es el caso cuando los aminoácidos en otras posiciones son conjugados con un ácido graso.

Además, varias sustituciones de aminoácido relativas a la OXM humana de tipo silvestre en los compuestos reivindicados son capaces de mejorar la potencia en el Gcg-R y/o GLP-1-R, de este modo compensando la pérdida de potencia debido a la conjugación con el ácido graso mientras mantiene una relación apropiada de actividad co-agonista del Gcg-R/GLP-1-R. Es importante notar que una sustitución de un residuo de aminoácido en una proteína particular puede afectar las características de las proteínas como un todo, y que el efecto total puede ser benéfico o perjudicial a la potencia farmacológica y/o estabilidad farmacéutica. Ciertas sustituciones de aminoácido pueden incrementar la potencia, pero tienen un efecto perjudicial en la estabilidad de la molécula y *vice versa*. Las sustituciones de aminoácido en los compuestos de la presente invención con relación a la OXM

humana de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) incluyen S2Aib, S16E, R17K, R18K, Q20K, D21E, Q24E, M27L, N28E o N28S y T29G. En adición, la secuencia C-terminal de OXM, KRNRNNIA, ha sido reemplazada con una secuencia C-terminal de GPSSG.

La sustitución de S2Aib protege al péptido de la degradación por peptidasas, en particular, dipeptidil peptidasa IV. Las sustituciones S16E, R17K, R18K y Q20K son capaces de mejorar la potencia de los compuestos de la invención en ensayos *in vitro* y en modelos animales *in vivo*. Las sustituciones D21E y Q24E son capaces de mejorar la estabilidad de los compuestos de la invención y modular la actividad *in vitro*. La sustitución de M27L es capaz de proteger al péptido de la oxidación del residuo de metionina. La sustitución de N28E es capaz de mejorar la solubilidad de los compuestos que comprenden tal sustitución. La sustitución de N28S es también capaz de mejorar la solubilidad de los compuestos que comprenden tal sustitución, pero no en la misma extensión como la sustitución de N28E. Sin embargo, la solubilidad de los compuestos que comprenden una sustitución de N28S puede ser mejorada por selección de un enlazador apropiado. La sustitución del residuo de asparagina en la posición 28 evita la posibilidad de desamidación que ocurre en esta posición.

La remoción de los residuos de la secuencia C-terminal de OXM, KRNRNNIA, puede mejorar la solubilidad, lo

cual es atribuible a la remoción de los residuos de arginina. Los inventores evaluaron compuestos que tienen (i) secuencia no C-terminal, (ii) compuestos con una secuencia C-terminal de GPSSG y (iii) compuestos con una secuencia C-terminal de GPSSGAPPPS. Se encontró de manera sorprendente que ciertos compuestos con una secuencia C-terminal de GPSSG presentan potencia *in vivo* mejorada en modelos animales con relación a la OXM humana de tipo silvestre, compuestos con secuencia no C-terminal y compuestos con una secuencia C-terminal de GPSSGAPPPS. La secuencia C-terminal de GPSSG también mejora la estabilidad y solubilidad de los compuestos de conformidad con la invención con relación a la OXM humana de tipo silvestre y compuestos con secuencia no C-terminal.

Los compuestos de la presente invención de este modo contienen sustituciones de aminoácido que, separadamente o en conjunto, no solamente son capaces de mejorar la potencia, sino también son capaces de proporcionar características de solubilidad y estabilidad física mejorada y estabilidad *in vivo* incrementada.

En algunos aspectos de los compuestos de la presente invención, el ácido graso C14-C24 es conjugado al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lisina mediante un enlazador, en donde el enlazador se selecciona a partir del grupo que consiste de:

(a) un carboxilato de amino polietilenglicol de

Fórmula I:

$$H\text{-}\{NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}[O\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_m\text{-}O\text{-}(CH_2)_p\text{-}CO\}_n\text{-}OH \quad (I)$$

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12, y p es 1 o 2;

(b) un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu;

(c) un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico;

(d) un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro y γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu;

(e) un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de $(Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_q$ $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$ y $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$, $(\text{ácido 6-aminohexanoico})_s$, (ácido 5-

aminovalérico)$_s$, (ácido 7-aminoheptanoico)$_s$, y (ácido 8-aminoheptanoico)$_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15; y

(f) un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I como se define en (a) es conjugado con:

(i) un aminoácido seleccionado a partir del grupo que consiste de Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu;

(ii) un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico;

(iii) un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro y γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu; o

(iv) un polipéptido seleccionado a partir del grupo

que consiste de $(Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_q$ $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$ y $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_r$, $(\text{ácido 6-aminohexanoico})_s$, $(\text{ácido 5-aminovalérico})_s$, $(\text{ácido 7-aminoheptanoico})_s$, y $(\text{ácido 8-aminoheptanoico})_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15.

En aspectos preferidos de los compuestos de la presente invención, el enlazador es un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I, o un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I es conjugado con un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido, como se define anteriormente, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, m es 1 y p es 1.

En aspectos más preferidos de los compuestos de la presente invención, el enlazador es un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I, o un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I es conjugado con un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido, como se define anteriormente, en donde n es 2, m es 1 y p es 1.

El enlazador de carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I, o el enlazador de conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I es conjugado con un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido, como se define anteriormente, comprende una

porción pequeña de polietilenglicol (PEG) que comprende una estructura $[-O-CH2-CH2-]_m$, en donde m es un número entero entre 1 y 12, (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12). Tales PEGs pequeños son referidos en la presente como una "mini-PEG". En aspectos preferidos, el mini-PEG tiene una estructura de Fórmula I:

$$H-\{NH-CH_2-CH_2-[O-CH_2-CH_2]_m-O-(CH_2)_p-CO\}_n-OH \quad (I)$$

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12 y p es 1 o 2. Preferiblemente, el mini-PEG tiene una estructura de Fórmula I, en donde n es 1, 2, 3, 4, 5 o 6, m es 1 y p es 1. Preferiblemente, además, el miniPEG tiene una estructura de Fórmula I en donde n es 1, m es 1 y p es 1. Reactivos adecuados para uso en la acilación de un aminoácido con un mini-PEG son comercialmente disponibles a partir de vendedores, tales como Peptides International (Louisville, KY) and ChemPep, Inc. (Wellington, FL). También, técnicas adecuadas para acilación de un aminoácido con un mini-PEG se describen en la presente (véase Ejemplos 1-4).

El mini-PEG de Fórmula I es un miniPEG funcionalizado que comprende un grupo funcional amina y un grupo funcional carboxilo. El grupo funcional carboxilo reacciona con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lisina para formar un enlace amida. El grupo funcional amina reacciona con un grupo carboxilo del ácido graso. La Lisina

en la posición 20 del péptido de la SEQ ID NO: 2 es de este modo conjugado a un ácido graso C14-C24 mediante el mini-PEG de Fórmula I.

Alternativamente, cuando el mini-PEG de Fórmula I es parte de un enlazador conjugado (es decir, un mini-PEG de Fórmula I conjugado a un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido como se define anteriormente), el grupo funcional amina del mini-PEG de Fórmula I reacciona con un grupo funcional del aminoácido, dipéptido, tripéptido o polipéptido. Un grupo funcional adicional del aminoácido, dipéptido, tripéptido o polipéptido reacciona con un grupo carboxilo del ácido graso. La Lisina en la posición 20 del péptido de la SEQ ID NO: 2 es de este modo conjugado al ácido graso C14-C24 mediante un enlazador conjugado como se define anteriormente.

La naturaleza hidrofílica del mini-PEG de Fórmula I sirve para incrementar la solubilidad de los compuestos de la invención que comprende un enlazador que comprende un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I o un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I es conjugado a un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido, como se define.

Enlazadores preferidos que comprenden un mini-PEG de Fórmula I incluyen, pero no se limitan a, ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$ y ácido 8-amino-3,6-

dioxaoctanoico.

El enlazador puede también ser un aminoácido único posicionado entre el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lisina y el ácido graso C14-C24. En algunos aspectos preferidos, el aminoácido es un aminoácido hidrofílico. Aminoácidos adecuados incluyen Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu.

En aspectos más preferidos, el aminoácido es γ-Glu.

Alternativamente, el enlazador es un dipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Glu-Glu, Gly-Gly, Leu-Leu, Pro-Pro, Ser-Ser, Thr-Thr, γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu, γ-Glu-Glu, γ-Abu-γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico-ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico-ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico-ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico-ácido 8-aminoheptanoico.

En un aspecto alternativo adicional, cada aminoácido del dipéptido puede ser el mismo como o diferente del otro aminoácido del dipéptido, y pueden ser seleccionados independientemente a partir del grupo que consiste de Ala, β-Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, γ-Glu, γ-Abu, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico.

En aspectos más preferidos, el enlazador es γ-Glu-γ-Glu.

En algunos aspectos, el enlazador es un tripéptido en donde los aminoácidos del tripéptido son seleccionados independientemente a partir del grupo que consiste de: Ala, β-Ala, Glu, Gly, Leu, Pro, Ser, Thr, ácido γ-aminobutírico (γ-Abu), ácido γ-glutámico (γ-Glu), ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, y ácido 8-aminoheptanoico.

En aspectos preferidos, el enlazador es un tripéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de Ala-Ala-Ala, β-Ala-β-Ala-β-Ala, Glu-Glu-Glu, γ-Glu-γ-Glu-γ-Glu, Glu-γ-Glu-γ-Glu, γ-Glu-γ-Glu-Glu, γ-Glu-Glu-γ-Glu, Gly-Gly-Gly, Gly-Gly-Ser, Ser-Gly-Gly, Gly-Ser-Gly, Gly-Gly-Glu, Glu-Gly-Gly, Gly-Glu-Gly, Gly-Gly-γ-Glu, γ-Glu-Gly-Gly, Gly-γ-Glu-Gly, Leu-Leu-Leu, Pro-Pro-Pro y γ-Abu-γ-Abu-γ-Abu.

En algunos aspectos, el enlazador es un polipéptido seleccionado a partir del grupo que consiste de $(\text{Gly-Gly-Ser})_q$ $(\text{Gly-Gly-Gly-Ser})_r$ y $(\text{Gly-Gly-Gly-Gly-Ser})_r$, $(\text{ácido 6-aminohexanoico})_s$, $(\text{ácido 5-aminovalérico})_s$, $(\text{ácido 7-aminoheptanoico})_s$, y $(\text{ácido 8-aminoheptanoico})_s$, donde q es cualquier número entero desde 2 hasta 5, r es cualquier número entero desde 1 hasta 3, y s es cualquier número entero desde 4 hasta 15.

En un aspecto preferido, el enlazador es un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I:

$$H\text{-}\{NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}[O\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_m\text{-}O\text{-}(CH_2)_p\text{-}CO\}_n\text{-}OH \qquad (I)$$

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12, y p es 1 o 2,

es conjugado con un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido, como se define anteriormente.

En un aspecto preferido, el carboxilato de amino polietilenglicol del enlazador de conjugado es ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$ o ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico.

En un aspecto más preferido, el enlazador comprende ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_t$ (también referido como (AEEA)$_2$-(γ-Glu)$_t$), en donde t es 1 o 2. El ácido graso y el ácido gamma-glutámico en el enlazador actúan como aglutinantes de albúmina, y proporcionan el potencial para generar compuestos de acción prolongada *in vivo*. En los aspectos muy preferidos, los compuestos de la presente invención comprenden una lisina en la posición 20 que es químicamente modificada por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lisina con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_t$-CO-(CH$_2$)$_d$-CO$_2$H, en donde t es 1 o 2 y d es 16 o 18.

Como se muestra en las estructuras químicas de los Ejemplos 1-4, la primera unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo está ligada al grupo épsilon-amino de la cadena

lateral de Lisina. La segunda unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo es entonces unida al grupo amino de la primera unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo. Entonces, la primera unidad de γ-Glu está unida al grupo amino de la segunda unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo a través del grupo γ-carboxilo de la cadena lateral. Cuando t = 2, la segunda unidad de γ-Glu está unida al grupo α-amino de la primera unidad de γ-Glu a través del grupo γ-carboxilo de la cadena lateral. Finalmente, el ácido graso está unido al grupo α-amino de la primera (cuando t = 1) o segunda (cuando t = 2) unidad de γ-Glu.

Cuando el enlazador es un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, o un polipéptido, como se define anteriormente, se prefiere que el aminoácido, o al menos un aminoácido del dipéptido, tripéptido o polipéptido, sea un aminoácido hidrofílico.

De manera similar, cuando el enlazador es un enlazador conjugado en donde un carboxilato de amino polietilenglicol de Fórmula I:

$$H\text{-}\{NH\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}[O\text{-}CH_2\text{-}CH_2]_m\text{-}O\text{-}(CH_2)_p\text{-}CO\}_n\text{-}OH \qquad (II)$$

en donde m es cualquier número entero desde 1 hasta 12, n es cualquier número entero desde 1 hasta 12, y p es 1 o 2;

es conjugado con un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido o un polipéptido, como se define anteriormente, se

prefiere que el aminoácido/al menos un aminoácido del aminoácido/dipéptido/tripéptido/polipéptido sea un aminoácido hidrofílico.

Aminoácidos adecuados incluyen, pero no se limitan a, Arg, Asn, Asp, Gln, Glu, His, Lys, Pro, Ser, Thr, Cit, Orn, Sar, Gly, γ-Abu y γ-Glu.

Los presentes inventores descubrieron que la presencia de uno o más aminoácidos hidrofílicos en el enlazador compensan por una pérdida de solubilidad que puede ser normalmente esperada que ocurra como una consecuencia de una sustitución de aminoácido en la péptido de la SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, en la modalidad en donde el enlazador comprende $([2\text{-}(2\text{-aminoetoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma\text{-Glu})_t$, en donde t es 1 o 2, Xaa28 del péptido de la SEQ ID NO: 1 puede ser serina o ácido glutámico. La selección de ácido glutámico en la posición 28 del péptido de la SEQ ID NO: 2 mejora la solubilidad de tales compuestos. La selección de serina en la posición 28 del péptido de la SEQ ID NO: 2 podría esperarse reduzca la solubilidad de tales compuestos con relación a aquellos compuestos que difieren solamente por tener un residuo de ácido glutámico en la posición 28. Sin embargo, un segundo aminoácido γ-Glu en el enlazador descrito anteriormente (es decir, t es 2) compensa para esta reducción esperada en solubilidad.

Los compuestos de la presente invención utilizan un

ácido graso C14-C24 químicamente conjugado al grupo épsilon-amino de una cadena lateral de lisina ya sea por un enlace directo o por un enlazador. El término "ácido graso C14-C24" como se usa en la presente significa un ácido carboxílico con entre 14 y 24 átomos de carbono. El ácido graso C12-C24 adecuado para uso en la presente, puede ser un monoácido saturado o un diácido saturado. Por "saturado" significa que el ácido graso no contiene doble o triple enlaces carbono-carbono.

Ejemplos de ácidos grasos C14-C24 saturados específicos que son adecuados para los compuestos y usos de los mismos descritos en la presente incluyen, pero no se limitan a, ácido mirístico (ácido tetradecanoico)(monoácido C14), ácido tetradecandioico (diácido C14), ácido palmítico (ácido hexadecanoico)(monoácido C16), ácido hexadecandioico (diácido C16), ácido margárico (ácido heptadecanoico)(monoácido C17), ácido heptadecandioico (diácido C17), ácido esteárico (ácido octadecanoico)(monoácido C18), ácido octadecandioico (diácido C18), ácido nonadecílico (ácido nonadecanoico)(monoácido C19), ácido nonadecandioico (diácido C19), ácido aracádico (ácido eicosanoico)(monoácido C20), ácido eicosandioico (diácido C20), ácido heneicosílico (ácido heneicosanoico)(monoácido C21), ácido heneicosandioico (diácido C21), ácido behénico (ácido docosanoico)(C22), ácido

docosandioico (diácido C22), ácido lignocérico (ácido tetracosanoico)(monoácido C24), ácido tetracosandioico (diácido C24), que incluyen derivados de los mismos ramificados y sustituidos.

En aspectos preferidos de los compuestos de la presente invención, el ácido graso C14-C24 se selecciona a partir del grupo que consiste de un monoácido C14 saturado, un diácido C14 saturado, un monoácido C16 saturado, un diácido C16 saturado, un monoácido C18 saturado, un diácido C18 saturado, un diácido C19 saturado, un monoácido C20 saturado, un diácido C20 saturado, un diácido C22 saturado y, derivados de los mismos ramificados y sustituidos.

En aspectos más preferidos de los compuestos de la presente invención, el ácido graso C14-C24 se selecciona a partir del grupo que consiste de ácido mirístico, ácido tetradecandioico, ácido palmítico, ácido hexadecandioico, ácido esteárico, ácido octadecandioico, ácido nonadecandioico, ácido aracádico, ácido eicosandioico y ácido docosandioico.

Preferiblemente, el ácido graso C14-C24 es ácido octadecandioico o ácido eicosandioico.

Los presentes inventores han encontrado que la posición del ácido graso es crítica para lograr un compuesto con la relación deseada de actividad co-agonista del Gcg-R/GLP-1-R. L

La longitud y composición del ácido graso impacta la vida útil del plasma del compuesto, la potencia del compuesto en modelos animales *in vivo* y también impacta la solubilidad y estabilidad del compuesto. La conjugación del péptido definida en la SEQ ID NO: 2 a un monoácido o diácido graso saturado C14-C24 resulta en compuestos que presentan vida útil en plasma deseable, potencia deseable en modelos animales *in vivo* y también posee características de solubilidad y estabilidad deseadas. El ácido mirístico, ácido tetradecandioico, ácido palmítico, ácido hexadecandioico, ácido esteárico, ácido octadecandioico, ácido nonadecandioico, ácido aracádico, ácido eicosandioico y ácido docosandioico son ácidos grasos particularmente preferidos.

En particular, la conjugación del péptido definida en la SEQ ID NO: 2 en el residuo de Lisina en la posición 20 con ácido octadecandioico o ácido eicosandioico resulta en compuestos que: (i) son capaces de lograr las relaciones deseadas de actividad co-agonista del Gcg-R/GLP-1-R, (ii) son capaces de mejorar la potencia en modelos animales *in vivo* y/o (iii) son capaces de mejorar las características de estabilidad y solubilidad física.

Los compuestos de la invención son preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas administradas por rutas parenterales (*por ejemplo,* subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o transdermal).

Los compuestos de la presente invención típicamente serán administrados parenteralmente. La administración parenteral incluye, por ejemplo, administración sistémica, tal como por inyección intramuscular, intravenosa, subcutánea, intradermal, o intraperitoneal. La ruta preferida de administración es inyección subcutánea. Un compuesto de la presente invención es administrado al sujeto en conjunto con un portador, diluyente, o excipiente farmacéutico aceptable como parte de una composición farmacéutica para tratar diabetes tipo 2, obesidad, NAFLD y/o NASH. La composición farmacéutica puede ser una solución o una suspensión tal como una en la cual un compuesto de la presente invención es formado en complejo con un catión de metal divalente tal como zinc. Un compuesto de la presente invención puede también ser formulado en una formulación sólida tal como por liofilización o secado por atomización, la cual es entonces reconstituida en una solución diluyente adecuada previo a la administración. Los portadores farmacéuticos adecuados pueden contener ingredientes adecuados los cuales no interactúan con el péptido o derivado de péptido. Los portadores farmacéuticos adecuados para administración parenteral incluyen, por ejemplo, agua estéril, salina fisiológica, salina bateriostática (salina que contiene aproximadamente 0.9% mg/ml de alcohol bencílico), salina amortiguada de fosfato, solución de Hank, lactato de Ringer y similares.

Algunos ejemplos de excipientes adecuados incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, trehalosa, sorbitol, y manitol y preservativos tales como fenol y m-cresol.

Las técnicas de formulaciones farmacéuticas estándares, tales como aquellas descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006), pueden ser empleadas. Los compuestos de la presente invención alternativamente pueden ser formulados para administración a través de la ruta bucal, oral, transdermal, nasal, o pulmonar.

Los compuestos de la presente invención pueden reaccionar con cualquiera de un número de ácido orgánicos e inorgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. Véase, *por ejemplo,* P. Stahl, *et al*. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011). Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen sales de trifluoroacetato, clorhidrato y acetato.

Los compuestos de la presente invención pueden ser empleados para tratar diabetes, específicamente diabetes tipo 2. Sujetos adicionales quienes pueden beneficiarse del tratamiento con los compuestos de la presente invención,

incluyen aquellos con tolerancia a la glucosa alterada o glucosa en ayunas alterada, sujetos quienes su peso corporal es aproximadamente 25% o más arriba del peso corporal normal para la altura del sujeto y estructura corporal, sujetos que tienen uno o más precursores con diabetes tipo 2, sujetos quienes han tenido diabetes gestacional, y sujetos con trastornos metabólicos tales como aquellos que resultan de la secreción de insulina endógena reducida. Los compuestos de la presente invención pueden ser usados para prevenir sujetos con tolerancia a la glucosa alterada de proceder a desarrollar diabetes tipo 2, prevenir el deterioro de células-β pancreáticas, inducir la proliferación de células-β, mejorar la función de células-β, activar las células-β dormantes, promover la diferenciación de células en células-β, estimular la replicación de células-β, e inhibir la apoptosis de células-β. Otras enfermedades y condiciones que pueden ser tratadas o prevenidas usando compuestos de la invención en los métodos de la invención incluyen: Diabetes Juvenil de Comienzo en la Madurez (MODY) (Herman, et al., *Diabetes* 43:40, 1994); Diabetes de Adulto Autoinmune Latente (LADA) (Zimmet, et al., *Diabetes Med.* 11:299, 1994); tolerancia a la glucosa alterada (IGT) (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 22 (Supp. 1):S5, 1999); glucosa en ayunos alterada (IFG) (Charles, et al., *Diabetes* 40:796, 1991); diabetes gestacional (Metzger,

*Diabetes*, 40:197, 1991); síndrome metabólico X, dislipidemia, hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia, y resistencia a la insulina.

Los compuestos de la invención también pueden ser usados en métodos de la invención para tratar causas secundarias de diabetes (Expert Committee on Classification of Diabetes Mellitus, *Diabetes Care* 22 (Supp. l):S5, 1999). Tales causas secundarias incluyen exceso glucocorticoide, exceso de crecimiento hormonal, feocromocitoma, y diabetes inducida por fármaco. Los fármacos que pueden inducir diabetes incluyen, pero no se limitan a, piriminilo, ácido nicotínico, glucocorticoides, fenitoína, hormona tiroidea, agentes β-adrenérgicos, α-interferona y fármacos usados para tratar infección del VIH.

Los compuestos de la presente invención pueden ser efectivos en la supresión de la absorción de alimento y el tratamiento de obesidad.

Una "cantidad efectiva" de un compuesto de la presente invención es la cantidad que resulta en un efecto terapéutico y/o profiláctico sin causar efectos secundarios inaceptables cuando se administra a un sujeto. Un "efecto terapéutico deseado" incluye uno o más de los siguientes: 1) un alivio del(los) síntoma(s) asociado(s) con la enfermedad o condición; 2) un retardo en el comienzo de los síntomas asociados con la enfermedad o condición; 3) longevidad

incrementada comparada con la ausencia del tratamiento; y 4) calidad de vida mayor comparada con la ausencia del tratamiento. Por ejemplo, una "cantidad efectiva" de un compuesto de la presente invención para el tratamiento de T2D es la cantidad que podría resultar en mayor control de la concentración de glucosa en sangre que en la ausencia de tratamiento, de este modo resultando en un retardo en el comienzo de las complicaciones diabéticas tales como retinopatía, neuropatía, o enfermedad renal. Una "cantidad efectiva" de un compuesto de la presente invención para la prevención de diabetes tipo 2, por ejemplo, en sujetos con tolerancia a la glucosa alterada o glucosa en ayunos alterada, es la cantidad que podría retardar, comprado con la ausencia de tratamiento, el comienzo de los niveles elevados de glucosa en sangre que requieren tratamiento con fármacos anti-hiperglicémicos tales como sulfonilureas, tiazolidindionas, insulina y/o bisguanidinas.

Una "cantidad efectiva" de un compuesto de la presente invención administrada a un sujeto también dependerá del tipo y severidad de la enfermedad y de las características del sujeto, tales como la salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos. La dosis de un compuesto de la presente invención efectiva para normalizar la glucosa en sangre del sujeto, dependerá de un número de factores, entre los cuales están incluidos, sin

limitación, el sexo del sujeto, peso y edad, la severidad o incapacidad para regular la glucosa en sangre, la ruta de administración y biodisponibilidad, el perfil de farmacocinética del péptido, la potencia, y la formulación.

Ciertos compuestos de la presente invención son en general efectivos sobre un amplio intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, dosificaciones por dosificaciones una vez a la semana pueden caer dentro del intervalo de aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente 30 mg por persona por semana. Ciertos compuestos de la presente invención pueden ser dosificados diariamente. Adicionalmente, ciertos compuestos de la presente invención pueden ser dosificados cada dos semanas, una vez semanalmente o mensualmente.

Un "sujeto" es un mamífero, preferiblemente un humano, pero también puede ser un animal, que incluye animales de compañía (por ejemplo, perros, gatos, y similares), animales de granja (por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos y similares) y animales de laboratorio (por ejemplo, ratas, ratones, cobayos, y similares).

Como se usa en la presente, el término "tratar" o "trata" incluye restringir, disminuir, detener, o invertir el progreso o severidad de un síntoma o trastorno existente.

El término "vida útil en plasma" se refiere al tiempo requerido para que la mitad de todos los compuestos

relevantes sean separados del plasma. Un término alternativamente usado es “vida útil de eliminación”. El término “extendido” o “prolongado” usado en el contexto de vida útil en plasma o vida útil de eliminación indica que existe un incremento significante en la vida útil de un compuesto de la presente invención con relación a aquel de la molécula de referencia (por ejemplo, forma conjugada de ácido no graso del péptido, OXM humana de tipo silvestre o semaglútida) como se determina bajo condiciones comparables.

La separación es una medida de la capacidad del cuerpo para eliminar un fármaco de la circulación. Como la separación disminuye debido, por ejemplo, a modificaciones a un fármaco, la vida útil podría esperarse incremente. Sin embargo, esta relación recíproca es exacta solamente cuando no existe cambio en el volumen de distribución. Una relación aproximada útil entre la vida útil log-lineal terminal ($T_{1/2}$), separación (C) y volumen de distribución (V) se proporciona por la ecuación: $T_{1/2} \approx 0.693\ (V/C)$. La separación no indica cuando fármaco está siendo removido sino, preferiblemente, el volumen de fluido biológico tal como sangre o plasma que podría tener que ser completamente liberado del fármaco para considerarlo para la eliminación. La separación es expresada como un volumen por unidad de tiempo.

Como se usa en la presente, el término “hidrofílico” se refiere a la propiedad de ser capaz de

absorber fácilmente humedad y tener grupos fuertemente polares que interactúan rápidamente con agua.

Como se usa en la presente, “semaglutida” se refiere a un análogo de GLP-1 químicamente sintetizado que tiene el esqueleto de péptido y la estructura total del compuesto de aquel encontrado en el Número de Registro CAS 910463-68-2.

Las secuencias de aminoácido de la presente invención contienen los códigos estándares de una letra o de tres letras para los veinte aminoácidos que se originan naturalmente. Adicionalmente, “Aib” es ácido alfa aminoisobutírico, “Abu” es ácido aminobutírico, “Orn” es ornitina, “Cit” es citrulina y “Sar” es sarcosina.

Como se usa en la presente, el término “aminoácido C-terminal” se refiere al último aminoácido en la secuencia de un péptido que contiene un grupo carboxilo libre. El aminoácido C-terminal de los compuestos de la presente invención es Gly en la posición 34.

La presente invención también abarca intermediarios y procesos novedosos útiles para la síntesis de los compuestos de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. Los intermediarios y compuestos de la presente invención pueden ser preparados por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. En particular, el proceso usando síntesis química es ilustrado

en los Ejemplos abajo. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las rutas descritas pueden ser combinadas en diferentes formas para preparar compuestos de la presente invención, o sales de los mismos. Los reactivos y materiales de partida son fácilmente disponibles para uno de habilidad ordinaria en la técnica. Se entiende que estos Ejemplos no están propuestos para ser limitantes al alcance de la invención en cualquier forma.

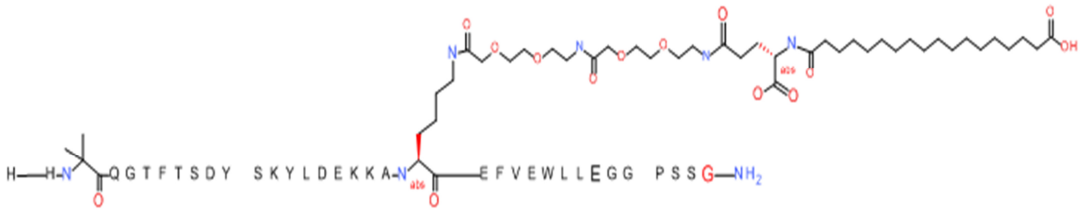
**EJEMPLO 1**

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

en donde Xaa2 es Aib;

K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_1$-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H; y

el aminoácido C-terminal es amidado con una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 5).




El diagrama anterior representa la estructura del

compuesto de la SEQ ID NO: 5 (posteriormente referido como "Compuesto 1") usando el código estándar de aminoácido de una letra con la excepción de los residuos Aib2 y K20 donde las estructuras de estos aminoácidos han sido expandidas.

El componente peptídico del Compuesto 1 es sintetizado por síntesis de fase sólida automatizada usando química de Fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc)/terc-Butilo (t-Bu) en un sintetizador peptídico múltiple de 12 canales Symphony (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

La resina de síntesis consiste de 1% de poliestireno reticulado con DVB (resina de Baja Carga Fmoc-Rink-MBHA, malla 100-200, EMD Millipore, Temecula, CA) a una sustitución de 0.3-0.4 meq/g. Los grupos protectores de cadena lateral estándares son como sigue: terc-butiloxicarbonilo (Boc) para Trp y Lys; éster terc-butílico (OtBu) para Asp y Glu; tBu para Ser, Thr y Tyr; y trifenilmetilo (Trt) para Gln; N-α-Fmoc-N-ε-4-metiltritil-L-lisina (Fmoc-Lys(Mtt)-OH) se usó para la Lisina en la posición 20 de la SEQ ID NO: 3 y $N_{\alpha}$,$N_{(im)}$-di-Boc-L-histidina (Boc-His(Boc)-OH) se usó para la histidina en la posición 1. Los grupos Fmoc se removieron previo a cada etapa de acoplamiento (2 x 7 minutos) usando 20% de piperidina en dimetilformamida (DMF). Todos los acoplamientos de aminoácido estándares se realizaron por 1 hora, usando una relación molar igual de aminoácido Fmoc (EMD Millipore, Temecula, CA),

diisopropilcarbodiimida (DIC)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) y Oxima (Oxyma Pure, Iris Biotech, Marktredwitz, Germany), en un exceso molar de 9 veces sobre la carga peptídica teórica y a una concentración final de 0.18 M en DMF.

Dos excepciones son el residuo de glutamina en la posición 3 de la SEQ ID NO: 5, en cual es acoplado doble (2 x 1 hora), y el residuo de histidina en la posición 1 de la SEQ ID NO: 5, el cual se acopló a un exceso molar de 6 veces usando 1-Hidroxi-7-azabenzotriazol (HOAt) en lugar de Oxima por 18 horas. Después de la terminación de la síntesis del péptido lineal, la resina se transfirió a una jeringa de polipropileno de 25 mL de frita desechable (Torviq, Niles, MI) equipada con una llave de cierre de politetrafluoroetileno (PTFE) (Biotage, Charlotte, NC) y el grupo protector 4-metiltritilo (Mtt) en la Lisina en la posición 20 de la SEQ ID NO: 5 fue selectivamente removido de la resina peptídica usando tres tratamientos con 20% de hexafluoroisopropanol (Oakwood Chemicals, West Columbia, SC) en DCM (2 x 10 minutos y 1 x 45 minutos) para exponer la amina épsilon libre de la Lisina en la posición 20 y hacerla disponible para reacción adicional.

La subsecuente unión de la porción del enlazador de ácido graso se llevó a cabo realizando dos acoplamientos exitosos de ácido [2-(2-(Fmoc-amino)etoxi)etoxi]acético (Fmoc-AEEA-OH) (ChemPep, Inc. Wellington, FL; exceso de 3

veces de aminoácido (AA):hexafluorofosfato de 1-[Bis(dimetilamino)metileno]-1H-1,2,3-triazolo[4,5-b]piridinio-3-óxido (HATU): *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) [1:1:5 mol/mol] por un tiempo de acoplamiento de 3 horas), seguido por acoplamiento de Fmoc-ácido α glutámico-t-butil éster (Fmoc-Glu-OtBu)(Ark Pharm, Inc. Libertyville IL, exceso de 3 veces de AA:HATU:DIPEA [1:1:5 mol/mol] por un tiempo de acoplamiento de 3 horas). En cada caso, la porción Fmoc se removió como se describe anteriormente. Finalmente, el ácido mono-OtBu-octadecandioico (WuXi AppTec, Shanghai, China) se acopló a la resina durante 18 horas usando un exceso de 3 veces de ácido:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol).

Después que la síntesis se completó, la resina peptídica se lavó con diclorometano (DCM), éter dietílico y se secó en aire completamente aplicando succión por vacío a la jeringa por 5 minutos. La resina seca se trató con un cóctel de escisión (ácido trifluoroacético (TFA):anisol:agua:triisopropilsilano, 88:5:5:2 v/v) por 2 horas a temperatura ambiente para liberar el péptido del soporte sólido y remover todos los grupos protectores de cadena lateral. La resina se filtró, se lavó dos veces con TFA puro, y los filtrados combinados se trataron con éter dietílico frío para precipitar el péptido crudo. La suspensión de péptido/éter entonces se centrifugó a 4000 rpm para formar una pelotilla sólida, el sobrenadante se decantó,

y la pelotilla sólida se trituró con éter dos veces adicionales y se secó *in vacuo*. El péptido crudo se solubilizó en 20% de acetonitrilo/agua y se purificó por RP-HPLC en una columna preparativa C8 (Luna 21 x 250 mm, Phenomenex, Torrance, CA) con gradientes lineales de acetonitrilo y agua usando tres diferentes sistemas amortiguadores:

1) 0.1 M de acetato de amonio en agua, pH 5.0;
2) 0.1 % TFA en agua; y
3) 5% de ácido acético en agua.

La liofilización subsecuente de la combinación de producto principal final proporciona la sal de acetato de péptido liofilizado.

En una síntesis realizada esencialmente como se describe anteriormente, la pureza del Compuesto 1 se evaluó usando RP-HPLC analítica y se encontró por ser >97%.

El peso molecular se determinó por MS de electro-rocío analítico. El peso molecular del Compuesto 1 se calculó por ser 4535.0 Daltons mientras el peso molecular promedio descomplejado observado se determinó por ser 4535.0 Daltons y se observaron los siguientes iones: 1512.3 (M+3H), 1134.3 (M+4H), 908 (M+5H).

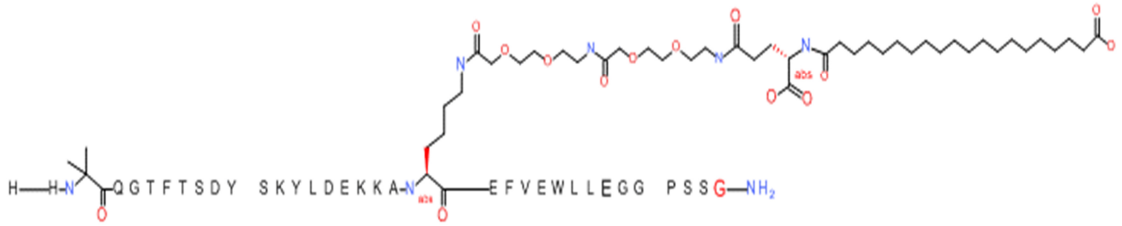
**EJEMPLO 2**

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG

en donde Xaa2 es Aib;

K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_1$-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H; y

el aminoácido C-terminal es amidado con una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6).




El diagrama anterior representa la estructura del compuesto de la SEQ ID NO: 6 (posteriormente referido como "Compuesto 2") usando el código estándar de aminoácido de una letra con la excepción de los residuos Aib2 y K20 donde las estructuras de estos aminoácidos han sido expandidas.

El Compuesto 2 es sintetizado como en el Ejemplo 1, excepto que el ácido mono-OtBu-eicosandioico (WuXi AppTec, Shanghai, China) es acoplado a la resina durante 18 horas usando un exceso de 3-veces de AA:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol), en lugar de ácido mono-OtBu-octadecandioico como en el Ejemplo 1.

El peso molecular del Compuesto 2 se calcula por ser 4563.1 Daltons mientras el peso molecular promediado descomplejado observado se determinó por ser 4562.9 Daltons y

se observaron los siguientes iones: 1521.7 (M+3H), 1141.3 (M+4H), 913.5 (M+5H).

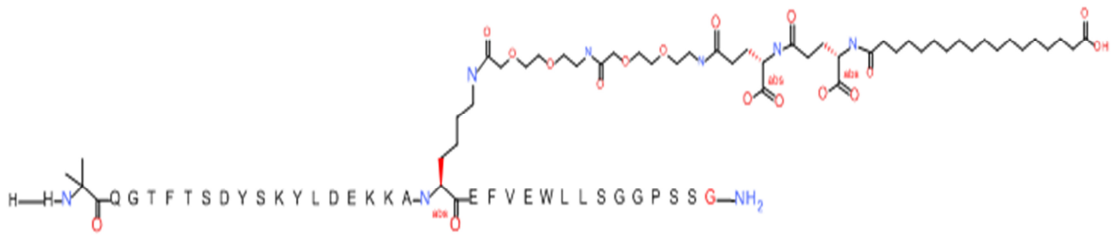
**EJEMPLO 3**

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

en donde Xaa2 es Aib;

K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_2$-CO-(CH$_2$)$_{16}$-CO$_2$H; y

el aminoácido C-terminal es amidado con una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7).




El diagrama anterior representa la estructura del compuesto de la SEQ ID NO: 7 (posteriormente referido como "Compuesto 3") usando el código estándar de aminoácido de una letra con la excepción de los residuos Aib2 y K20 donde las estructuras de estos aminoácidos han sido expandidas.

El Compuesto 3 es sintetizado como en el Ejemplo 1, excepto que se agregó una porción adicional de Fmoc-Glu-OtBu en el ciclo de síntesis del enlazador.

El peso molecular del Compuesto 3 se calcula por

ser 4622.1 Daltons mientras el peso molecular promedio descomplejado se determinó por ser 4621.9 Daltons y se observaron los siguientes iones: 1541.3 (M+3H), 1156.2 (M+4H), 925.2 (M+5H).

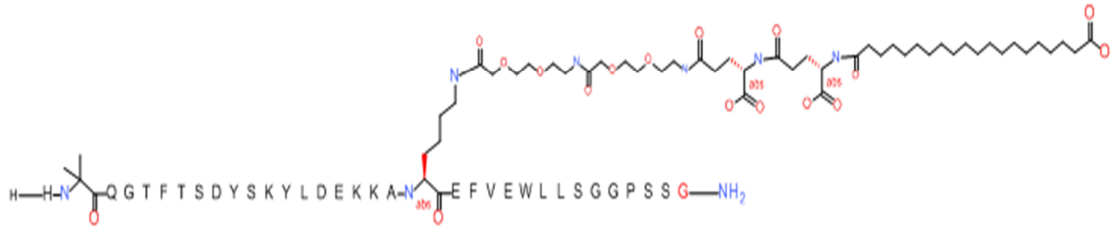
**EJEMPLO 4**

HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG

en donde Xaa2 es Aib;

K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_2$-CO-(CH$_2$)$_{18}$-CO$_2$H; y

el aminoácido C-terminal es amidado con una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 8).




El diagrama anterior representa la estructura del compuesto de la SEQ ID NO: 8 (posteriormente referido como "Compuesto 4") usando el código estándar de aminoácido de una letra con la excepción de los residuos Aib2 y K20 donde las estructuras de estos aminoácidos han sido expandidas.

El Compuesto 4 es sintetizado como en el Ejemplo 1, excepto que ácido mono-OtBu- eicosandioico (WuXi AppTec, Shanghai, China) es acoplado a la resina durante 18 horas

usando un exceso de 3-veces de AA:HATU:DIPEA (1:1:5 mol/mol), en lugar de ácido mono-OtBu-octadecandioico usado en el Ejemplo 1. Además, se agrega una porción adicional de aminoácido Fmoc-Glu-OtBu en el ciclo de síntesis del enlazador.

El peso molecular del péptido se calcula por ser 4650.1 Daltons mientras el peso molecular promedio descomplejado observado se determina por ser 4650.1 Daltons y se observaron los siguientes iones: 1550.7 (M+3H), 1163.3 (M+4H), 930.8 (M+5H).

**CARACTERÍSTICAS FÍSICAS**

Viscosidad

La viscosidad de los compuestos de la presente invención se midió en un Viscómetro Rheosense mVroc con los siguientes ajustes:

(a) Tamaño de jeringa: jeringa de 500 µl

(b) Velocidad de Flujo: velocidad de flujo 100 µl/min

(c) Temperatura Promedio: 25°C

(d) Velocidad de Corte: 1934 $s^{-1}$

Se pesó polvo seco (compuesto), disuelto en agua como un precipitado turbio, y se tituló a aproximadamente pH 8.0 con NaOH 1N. La solución se sonicó y se agitó con la mano hasta que el péptido se convirtió en solución. Las muestras son filtradas estériles (filtro PVDF 0.22 µm). Las muestras

entonces se analizaron por UV-Vis para valorar las concentraciones de solución base. Las soluciones se diluyeron a concentración final usando m-cresol 3X en amortiguador Tris a pH 8.0 10 mM a concentraciones finales de aproximadamente 10 mg/ml de péptido por peso en Tris 10 mM + 3 mg/ml de m-cresol a pH 8.0. Las muestras se rellenaron a través de filtro de 0.22 µm inmediatamente antes del análisis de viscosidad. Se removieron 25 µl de muestra para verificar la concentración por RP-HPLC antes y después del análisis.

Se midieron las muestras de control de agua y amortiguador antes y después de cada muestra sea analizada. El instrumento se lavó con amortiguador (3X) entre análisis de cada muestra. Las muestras se cargaron en jeringas individuales y se analizaron. No se incluye la primera medición en el cálculo final para permitir equilibrio con el sistema. Las muestras entonces se analizaron por triplicado (n = 3).

La viscosidad de los Compuestos 1-4 se midió esencialmente como se describe en este ensayo. Los datos de viscosidad para los Compuestos 1-4 se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos de viscosidad para Compuestos 1-4

| Muestra | Viscosidad de jeringa de 500 µL (cP o mPa-s) |
|---|---|
| Control de Amortiguador | 0.99 |
| Compuesto 1 | 1.06 |
| Compuesto 2 | 1.04 |
| Compuesto 3 | 1.03 |
| Compuesto 4 | 1.05 |

Solubilidad

La solubilidad de los compuestos de la presente invención se midió en un HPLC Agilent 1100, un HPLC Agilent 1200 y un Nanodrop 2000. Se usaron las siguientes columnas HPLC:

(a) RP-HPLC: Waters Symmetry Shield C18, 3.6 um, 4.6 x 100 mm

(b) HPLC-SEC: Tosoh Biosciences, $TSK2000_{SWXL}$ 7.8 cm x 30 mm

Todas las concentraciones del péptido se hicieron a 10 mg/ml en lo siguiente:

(a) Tris pH 8.0 10 mM + 3 mg/ml de m-cresol

(b) Tris pH 8.0 10 mM + 3 mg/ml de m-cresol + NaCl 150 mM

(c) Tris pH 8.0 10 mM + 3 mg/ml de m-cresol + 0.02% de Tween-20

(d) PBS pH 7.4

Se concentró 5 ml de péptido 10 mg/ml disuelto en

Tris pH 8.0 10 mM a aproximadamente 20 mg/ml usando el dispositivo MWCO Amicon-ultra 3kDa. La solución de filtró usando filtros 0.22 µM Millivex (membrana PVDF) y la concentración final se midió por el espectrómetro NanoDrop. Esta solución base se usó para formular las condiciones finales descritas anteriormente usando soluciones base m-cresol 3x, NaCl 10x y Tween-20 100x. También se preparó la solución PBS 10 mg/ml disuelta directamente a 5 mg/ml y concentrada usando el dispositivo MWCO Amicon-ultra 3kDa.

Cada solución se colocó en un refrigerador a 4°C por 1 semana, con el análisis para RP-HPLC para valorar la concentración y HPLC-SEC para valorar la formulación de especies HMW. Análisis completado en la semana T-0 y T-1.

La solubilidad de los Compuestos 1-4 se midió esencialmente como se describe en este ensayo. Los datos de solubilidad para los Compuestos 1-4 se resumen en las Tablas 2(a)-(d).

Tabla 2(a): Datos de solubilidad para el Compuesto 1

| PARÁMETRO | SUMARIO |
|---|---|
| Solubilidad/ Disolución | Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3 mg/ml en m-cresol (T8m);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + NaCl 150 mm (T8Nm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + 0.02% de Tween-20(T8Tm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en PBS, pH 7.4;<br>Precipitación no visible o separación de fase observada después de 1 semana de almacenamiento a 4°C;<br>Formulación de especies HMW no observada por SEC-HPLC;<br>RP-HPLC verifica la concentración a 10 mg/ml mantenida durante el curso de 1 semana de estudio |

Tabla 2(b): Datos de solubilidad para el Compuesto 2

| PARÁMETRO | SUMARIO |
|---|---|
| Solubilidad/ Disolución | Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3 mg/ml en m-cresol (T8m);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + NaCl 150 mm (T8Nm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + 0.02% de Tween-20(T8Tm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en PBS, pH 7.4;<br>Precipitación no visible o separación de fase observada después de 1 semana de almacenamiento a 4°C;<br>Formulación de especies HMW no observada por SEC-HPLC;<br>RP-HPLC verifica la concentración a 10 mg/ml mantenida durante el curso de 1 semana de estudio |

Tabla 2(c): Datos de solubilidad para el Compuesto 3

| PARÁMETRO | SUMARIO |
|---|---|
| Solubilidad/ Disolución | Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3 mg/ml en m-cresol (T8m);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + NaCl 150 mm (T8Nm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + 0.02% de Tween-20(T8Tm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en PBS, pH 7.4;<br>Precipitación no visible o separación de fase observada después de 1 semana de almacenamiento a 4°C;<br>Formulación de especies HMW no observada por SEC-HPLC;<br>RP-HPLC verifica la concentración a 10 mg/ml mantenida durante el curso de 1 semana de estudio |

Tabla 2(d): Datos de solubilidad para el Compuesto 4

| PARÁMETRO | SUMARIO |
|---|---|
| Solubilidad/ Disolución | Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3 mg/ml en m-cresol (T8m);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + NaCl 150 mm (T8Nm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en Tris pH 8 + 3mg/ml en m-cresol + 0.02% de Tween-20(T8Tm);<br>Solubilidad 10 mg/ml en PBS, pH 7.4;<br>Precipitación no visible o separación de fase observada después de 1 semana de almacenamiento a 4°C;<br>Formulación de especies HMW no observada por SEC-HPLC;<br>RP-HPLC verifica la concentración a 10 mg/ml mantenida durante el curso de 1 semana de estudio |

**FUNCIÓN *IN VITRO***

Afinidad de Unión de Compuestos 1-4 para el Receptor Geg Humano recombinante (hGeg-R) y Receptor GLP-1 Humano (hGLP-1-R)

Ensayos de unión de competición de radioligando

usando el ensayo de proximidad de escintilación (SPA) métodos y membranas preparadas de células establemente transfectadas 293HEK que sobreexpresan hGcg-O o hGLp-1-R se corrieron para determinar la constante de disociación del equilibrio (Ki) para Compuestos 1-4. Los protocolos experimentales y resultados se describen a continuación.

Ensayo de Unión al hGLP-1R

El ensayo de unión de receptor GLP-1 usa hGLP-1 clonado (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D. Chicchi GG, Strader DC, *Biochem Biophy Res Commun*. 196(1): 141-6, 1993) aislado de las células 293HEK que sobreexpresan hGLP-1R recombinante. El ADNc de hGLP-1R se subclonó en el plásmido phD de la expresión (Expresión trans-activada de proteína humana recombinante C gama-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. and Yan, S.B. Bio/Technology 5:1189-1192, 1987). Este ADN de plásmido es transfectado en células 293HEK y se selecciona con 200 µg/ml de Higromicina.

Se prepararon membranas de plasma crudas usando células del cultivo adherente. Las células se lisaron en hielo en amortiguador hipotónico que contiene HCl Tris 50 mM, pH 7.5 e inhibidores de Proteasa Complete™ Roche con EDTA. La suspensión celular se interrumpió usando un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio equipado con mano de mortero de Teflon® por 25 golpes. Lo homogeneizado se centrifugó a 4°C a

1100 x g durante 10 minutos. Lo sobrenadante se recolectó y almacenó en hielo, mientras las pelotillas se resuspendieron en amortiguador hipotónico y se rehomogeneizó. La mezcla se centrifugó a 1100 x g durante 10 minutos. El segundo sobrenadante se combinó con el primer sobrenadante y se centrifugó a 35000 x g durante 1 hora a 4°C. La pelotilla de membrana se resuspendió en amortiguador de homogenización que contiene inhibidores de proteasa, se congeló rápido en nitrógeno líquido y se almacenó como alícuotas en un congelador a -80°C hasta el uso.

GLP-1 se radioyodinó por el procedimiento I-125-lactoperoxidasa y se purificó por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer (NEX308). La actividad específica es 2200 Ci/mmol. Se realizó la determinación de $K_D$ por competición homóloga en lugar de unión a saturación debido a un alto contenido de propanol en el material I-125- GLP-1. El $K_D$ se estimó ser 1.24 nM y se usó para calcular el valor $K_i$ para todos los compuestos probados.

Se llevó a cabo el ensayo de unión del receptor usando un formato de Ensayo de Proximidad de Escintilación (SPA) con perlillas de aglutinina de germen de trigo (WGA) (Perkin Elmer). El amortiguador de unión contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintansulfónico 25 mM (HEPES), pH 7.4, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, bacitracin 0.1% (p/v) (Affymetrix), 0.003% (p/v) de monolaurato de polioxietilensorbitán (TWEEN ®

-20) e Inhibidores de Proteasa Complete™ Roche sin EDTA. Se disolvió GLP-1 en DMSO a 0.339 mg/ml (0.1 mM) y se congeló a -20°C en alícuotas de 100 µl. La alícuota GLP-1 se diluyó y se usó en ensayos de unión dentro de una hora. El análogo de péptido se disolvió en sulfóxido de dimetilo (DMSO) y se diluyó serialmente 3 veces en DMSO al 100%. Después, 5 µl del compuesto serialmente diluido en 100% de DMSO. Después, 5 µl del compuesto serialmente diluido o DMSO se transfirió en placas de ensayo de fondo claro 3632 Corning® que contienen 45 ml de amortiguador de unión del ensayo o control de GLP-1 no etiquetado (unión no específica (NSB) a 0.25 µM final). Después, 50 µl de membranas hGLP-1R (0.5 µg/pocillo), 50 µl de I-125 GLP-1 (0.15 nM final), y 50 µl de perlillas WGA (150 µg/pocillo) se agregaron, las placas se sellaron y se mezclaron en agitador de placa (ajuste 6) por minuto. Las placas se leyeron con un contador de escintilación MicroBeta ® Trilux PerkinElmer después de 12 horas de tiempo de ajuste a temperatura ambiente.

Los resultados se calcularon como un porcentaje de unión de I-125-GLP-1 específico en la presencia del compuesto. La concentración de $IC_{50}$ absoluta del compuesto se derivó por regresión no lineal de la unión específica en porcentaje de I-125-GLP-1 contra la concentración del compuesto agregado. La concentración $IC_{50}$ se convirtió a Ki usando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W.

H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

El $K_i$ de los compuestos 1-4, se muestran Gcg humano y GLP-1 humano (7-36)NH2 en el hGLP-1-R en la Tabla 3 abajo. El número de repeticiones (n) es indicado en paréntesis. Un calificador (>) indica que el % de inhibición no alcanza el 50% y el $K_i$ calculado es obtenido usando la mayor concentración probada. N = 1/n indica que los promedios no se calculan cuando todos los valores tienen un signo > y el valor mostrado es el valor mayor calculado.

Tabla 3: $K_i$ de Compuestos 1-4, Gcg humano y GLP-1 humano (7-36)$NH_2$ en el hGLP-1-R

| **Compuesto** | **$K_i$, nM ± SEM, (n)** |
|---|---|
| Compuesto 1 | 23.0 ± 5.5 (n= 6) |
| Compuesto 2 | 28.6 ± 4.8 (n = 4) |
| Compuesto 3 | 8.68 ± 1.60 (n = 4) |
| Compuesto 4 | 20.2 ± 8.2 (n = 4) |
| Gcg Humano | >940 (n = 1/2) |
| GLP-1 Humano (7-36)$NH_2$ | 0.75 ± 0.056 (n = 67) |

Ensayo de Unión al hGcg-R

El ensayo de unión del receptor Gcg utiliza hGcg-R clonado (Lok, S. *et al.*, (Gene 140 (2), 203-209 (1994)) aislado de células 293HEK que sobreexpresan el hGcg-R recombinante. El ADNc de hGCg-R se subclonó en el plásmido de expresión phD (expresión Trans-activada de proteína humana recombinante C gamma-carboxilada, un factor antitrombótico.

Grinnell. B.W., *et al.*, Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN plásmido es transfectado en células 293HEK y seleccionado con 200 µg/ml de Higromicina.

Las membranas de plasma cruda se prepararon usando células de cultivo adherente. Las células se lisaron en hielo en amortiguador hipotónico que contiene HCl Tris 50 mM, pH 7.5 e Inhibidores de Proteasa Complete™ Roche con EDTA. La suspensión celular se interrumpió usando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio equipado con un mano de mortero Teflon® por 25 golpes. Lo homogeneizado se centrifugó a 4°C a 1100 x g durante 10 minutos. Lo sobrenadante se recolectó y se almacenó en hielo mientras la pelotilla se resuspendió en amortiguador hipotónico y se rehomogeneizó. La mezcla se centrifugó a 1100 x g durante 10 minutos. El segundo sobrenadante se combinó con el primer sobrenadante y se centrifugó a 3500 x g durante 1 hora a 4°C. La pelotilla de membrana se resuspendió en amortiguador de homogenización que contiene inhibidores de proteasa, se congeló rápidamente en nitrógeno líquido y se almacenó como alícuotas en una congeladora a -80°C hasta el uso.

Gcg es radioyonidado por el procedimiento de I-125-lactoperoxidasa y se purificó por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer (NEX207). La actividad específica es 2200 Ci/mmol. La determinación de $K_D$ se realizó por competición homóloga en lugar de unión por saturación debido al alto

contenido de propanol en el material Gcg I-125. El $K_D$ es estimado por ser 3.92 nM y se usa para calcular los valores $K_i$ para todos los compuestos probados.

Se llevó a cabo el ensayo de unión del receptor usando un formato del Ensayo de Proximidad de Escintilación (SPA) con perlillas de aglutinina de germen de trigo (WGA) (Perkin Elmer). El amortiguador de unión contiene HEPES 25 nM, pH 7.4, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, 0.1% (p/v) de bacitracina (Affymetrix), 0.003% (p/v) de monolaurato de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20) e Inhibidores de Proteasa Complete™ Roche sin EDTA. Gcg se disolvió en DMSO a 3.48 mg/ml (1 mM) y se almacenó congelado a -20°C en alícuotas de 100 µl. La alícuota Gcg se diluyó y se usó en ensayos de unión durante una hora. El análogo del péptido se disolvió en DMSO y se diluyó serialmente 3 veces en 100% de DMSO. Después, 5 µl del compuesto serialmente diluido o DMSO se transfirió en placas de ensayo de fondo claro Corning® 3632 que contienen 45 µl de amortiguador de unión de ensayo o control Gcg no etiquetado (NSB a 1 µM final). Después, se agregaron 50 µl de membranas hGcg-R (0.5 µg/pocillo), 50 µl de I-125 Gcg (0.15 nM final en reacción), y 50 µl de perlillas WGA (150 µg/pocillo), las placas se sellaron y se mezclaron en un agitador de placa (ajuste 6) por 1 minuto. Las placas se leyeron con un contador de escintilación MicroBeta® PerkinElmer Trilux después de 12 horas de tiempo

de ajuste a temperatura ambiente.

Los resultados se calcularon como un porcentaje de unión I-125-Gcg específico en la presencia del compuesto. La concentración $IC_{50}$ absoluta del compuesto se deriva por regresión no lineal de la unión de porcentaje específico de I-125-Gcg contra la concentración del compuesto agregado. La concentración $IC_{50}$ se convierte a $K_i$ usando la ecuación Cheng-Prusoff) Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)). La $K_i$ de los Compuestos 1-4, Gcg humano y GLP-1 humano (7-36)$NH_2$ en el hGcg-R mostrado en la Tabla 4 a continuación. El número de repeticiones (n) es indicado en paréntesis, Un (>) calificador indica que % de inhibición no alcanza 50% y la $K_i$ calculada se obtiene usando la más alta concentración probada. n= 1/2 indica que los promedio no son calculados cuando todos los valores tienen un signo > y el valor resultante mostrado es el más alto valor calculado.

Tabla 4: $K_i$ de Compuestos 1-4, Gcg humano y GLP-1 humano(7-36)$NH_2$ en el hGcg-R

| **Compuesto** | **$K_i$, nM ± SEM, (n)** |
|---|---|
| Compuesto 1 | 14.6 ± 4.4 (n= 6) |
| Compuesto 2 | 17.7 ± 5.0 (n = 4) |
| Compuesto 3 | 37.3 ± 4.2 (n = 4) |
| Compuesto 4 | 27.4 ± 3.3 (n = 4) |
| Gcg Humano | 2.49 ± 0.24 (n = 73) |
| GLP-1 Humano (7-36)$NH_2$ | >2420 (n = 1/2) |

hGLP-1-R Funcional y ensayos del hGcg-R

Se determinó la actividad funcional en hGLP-1-R y hGcg-R que expresa línea de célula clonal HEK-293. Los protocolos experimentales y resultados se describen a continuación.

Cada receptor que sobreexpresa la línea de célula se trata con péptido en DMEM (Medio Eagle Modificado de Dulbecco Cat# 31053) suplementado con 1X GlutaMAX ™ (dipéptido de L-alanil-L-glutamina en 0.85% de NaCl, Gibco Cat# 35050), 0.25% FBS (suero de bovino fetal dializado, Gibco Cat# 26400), 0.05% de BSA fracción V (fracción V de albúmina de bovino, Gibco cat# 15260), IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 250 µM y HEPES 20 mM [N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-(ácido 2-etansulfónico), HyClone cat# SH30237.01] en un volumen de ensayo 40 µl. Después de 60 minutos de incubación a temperatura ambiente, el incremento resultante en cAMP intracelular (monofostato de adenosina 3',5' cíclica) es cuantitativamente determinada usando el kit de ensayo HTRF Dynamic 2 cAMP CisBio (62AM4PEJ), los niveles cAMP dentro de la celda se detectaron agregando el conjugado cAMP-d2 en amortiguador de lisis de célula (20 µl) seguido por el anticuerpo anti-cAMP-$Eu^{3+}$-Criptato, también en amortiguador de lisis de la célula (20 µl). El ensayo competitivo resultante se incubó por al menos 60 min a temperatura ambiente, entonces se detectó usando un

instrumento PerkinElmer Envision ® con excitación a 320 nm y emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades de visualización (emisión a 665nm*10,000) son inversamente proporcionales a la cantidad de cAMP presente y se convierten a cAMP nM por pocillo usando una curva estándar cAMP. La cantidad de cAMP generada (nM) en cada pocillo es convertida a un porcentaje dela respuesta máxima observada con ya sea GLP-1 humano (7-36)NH2 10 nM o Gcg humano 10 nM.

Un valor $EC_{50}$ relativo y porcentaje superior ($E_{máx}$) se derivan por análisis de regresión no lineal usando la respuesta de porcentaje máximo contra la concentración de péptido agregado, fijado a la ecuación logística de cuatro parámetros (Genedata Screener®).

Los datos funcionales para los Compuestos 1-4, GLP-1 humano (7-36)$NH_2$, Gcg humano y OXM humano de tipo silvestre se muestran en la Tabla 5 a continuación. Las medias para $EC_{50}$ se expresan como medios geométricos ± erros estándar de la media (SEM) con el número de repeticiones (n) indicado en paréntesis. Las medias para $E_{máx}$ se expresan como la media aritmética ± error estándar. ND significa que la actividad agonista no se detectó. Todos los valores mostrados son a tres (3) dígitos significantes.

Tabla 5: Potencia funcional ($EC_{50}$) y eficacia ($E_{máx}$) para Compuestos 1-4 de GLP-1(7-36)$NH_2$ humano, Gcg humano y OXM humana de tipo silvestre

| **Compuesto** | **GLP-1-R Humano** | | **Gcg-R Humano** | |
|---|---|---|---|---|
| | **$EC_{50}$, nM ± SEM (n)** | **% de $E_{máx}$** | **$EC_{50}$, nM ± SEM, (n)** | **% $E_{máx}$** |
| Compuesto 1 | 23.9 ± 4.5 (13) | 104 ± 7 | 7.21 ± 1.06 (13) | 112 ± 3 |
| Compuesto 2 | 83.1 ± 16.8 (15) | 107 ± 7 | 26.5 ± 2.2 (15) | 114 ± 5 |
| Compuesto 3 | 34.2 ± 9.4 (13) | 105 ± 5 | 15.3 ± 2.2 (13) | 104 ± 5 |
| Compuesto 4 | 106 ± 18 (13) | 85.2 ± 6.0 | 68.6 ± 7.2 (15) | 116 ± 4 |
| Gcg humano | ND | ND | 0.023 ± 0.014 (47) | 113 ± 1 |
| GLP-1 humano(7-36)$NH_2$ | 0.168 ± 0.008 (51) | 101 ± 1 | ND | ND |
| OXM humano tipo silvestre | 9.54 ± 1.34 (8) | 96.9 ± 5.7 | 0.757 ± 0.090 (8) | 121 ± 7 |

Activación funcional de GL-1R de rata en línea de célula de insulinoma INS1 832-3

Una línea de célula beta pancreática, célula INS1 832-3, se usó para determinar la actividad funcional de los Compuestos 1-4 en la estimulación de la producción cAMP en los receptores GLP-1 endógenos. Las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 (Hyclone, Cat# SH30027) suplementado con 10% de suero de bovino fetal, HEPES 10 mM, piruvato de sodio 1

mM, L-Glutamina 2 mM, 2-Mercaptoetanol 50 µM y Penicilina 100U/Estreptomicina 100 µg/ml a 37°C, incubadora de $CO_2$ a 5% y se hizo pasar dos veces a la semana.

El funcionamiento del ensayo requiere separación de las células de los matraces de cultivo usando Enzyme Free Cell Stripper y peletizado por centrifugación a 1000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. La pelotilla celular se resuspendió en Solución de Sal Balanceada de Earle (EBSS) suplementado con glucosa 11.2 mM & 0.1% de BSA. Se colocó 40 µl de suspensión celular a densidad de $1x10^6$/ml en placas negras de media área de 96 pocillos (Costar 3875) y se incubó en 37°C, incubadora de $CO_2$ a 5% por 2 horas para recuperación e inanición. Se prepararon diluciones seriales de los compuestos de prueba a concentración de prueba final 100X en DMSO 100%, y se diluyeron adicionalmente 20 veces en EBSS suplementado con glucosa 11.2 mM, BSA a 0.1% e IBMX 1.25 mM (Sigma I-7816). Después de 2 horas de inanición, las células se trataron con el compuesto agregando 10 µl de diluciones del compuesto 5X en las placas de célula (n = 2) y se incubaron en una incubadora de $CO_2$ 5% a 37°C por 30 minutos.

Se midió la concentración cAMP usando un kit cAMP HTRF (Cisbio): el conjugado cAMP-d2 en amortiguador de lisis celular (20 µl) seguido por el anticuerpo anti-cAMP-$Eu^{3+}$-Criptato, también en amortiguador de lisis celular (20 µl), se agregó a las células de la placa. El ensayo competitivo

resultante se incubó por al menos 60 minutos a temperatura ambiente y subsecuentemente se detectaron usando un instrumento Envision ® PerkinElmer con excitación a 320 nm y emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades envisión (emisión a 665 nm/620nm*10,000) son inversamente proporcional a la cantidad de cAMP presente y se convierten a cAMP nM por pocillo usando una curva estándar cAMP.

La concentración de cAMP en cada pocillo (nM) se calculó usando una curva estándar cAMP y se convirtió a un porcentaje de la respuesta máxima observada con péptido GLP-1 nativo a 300 nM para ajuste de curva.

Se derivaron un valor $EC_{50}$ relativo y porcentaje superior (% $E_{máx}$) por análisis de regresión no lineal usando la respuesta de porcentaje máximo contra la concentración del péptido agregado, ajustado por una ecuación logística de cuatro parámetros (software GraphPad Prism (Versión 6.05)). El ensayo se realizó con placas por duplicado. El número de repeticiones (n) se indicó en paréntesis.

Se calcularon $EC_{50}$ y % $E_{máx}$ para OXM humano de tipo silvestre, semaglutida y Compuestos 1 y 2 esencialmente como se describe anteriormente. Los datos $EC_{50}$ y % $E_{máx}$ para estos compuestos se proporcionan en la Tabla 6. Además, los compuestos 1 y 2 incrementan la producción de cAMP en una manera dependiente de la dosis (datos no mostrados).

Tabla 6: $EC_{50}$ de OXM de tipo silvestre, semaglutida y Compuestos 1 y 2 en el GLP-1-R de rata en línea de célula insulinoma INS1 832-3

| **Compuesto** | **$EC_{50}$ (nM)** | **$E_{máx}$ (%)** |
|---|---|---|
| OXM humano tipo silvestre | 7.3 (n=1) | 121.1 |
| Semaglutida | 5.8 (n=1) | 107.2 |
| Compuesto 1 | 26.1 (n=1) | 112.3 |
| Compuesto 2 | 62 (n=1) | 104.5 |

Activación funcional de hGcg-R en Hepatocitos Humanos Primarios

Se usaron hepatocitos humanos primarios para determinar la actividad funcional en producción de cAMP estimulante en los receptores Gcg endógeno. Se congelaron viales de hepatocitos primarios humanos en un tanque de nitrógeno líquido. Después de la eliminación, los viales se descongelaron inmediatamente en un baño de agua que tiene una temperatura de 37°C. Después se transfirió la suspensión celular a 50 ml de CHRM (Medio Recuperado de Hepatocito) Gibco/Life Technologies cat# CM7000.

La suspensión celular se centrifugó a 1,000 x g durante 10 min. Las pelotillas celulares se resuspendieron en 5 ml de Medio de Cultivo después de remover el CHRM por

aspiración. El medio de cultivo se preparó agregando contenidos completos de Packs suplementado con CM3000 a 500 ml Medio Williams (Gibco/Life Technologies), seguido por filtración estéril a través de una membrana 0.22 µm.

La densidad celular se cuantificó en hemocitómetro, agregando 100 µl de suspensión celular a 100 µl de Azul Tripano (Azul Tripano HyClone 0.04%, números de catálogo SV30084.01). La suspensión celular se diluyó adicionalmente en el Medio de Cultivo a la densidad celular final de 0.8 X 106 células por ml. Se agregó 65 ml de Medio de Cultivo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos recubiertos con Colágeno (Corning BioCoat, número de catálogo 354649, Lot# 22314033). Después se agregó 65 ml de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de 96 pocillos recubierta con Colágeno a una densidad celular final de 50 000 células por pocillo. La placa celular se incubó en una incubadora de $CO_2$ 5% a 37°C por 3-4 horas.

Después de 3-4 horas de incubación, el medio se aspiró y se reemplazó con 100 ml del medio de mantenimiento. El medio de mantenimiento se preparó agregando contenidos completos de Packs Suplementados con CM4000 a Medio Williams 500 ml (Gibco/Life Technologies), seguido por filtración estéril a través de una membrana 0.22 µm. La placa celular se regresó a la incubadora de $CO_2$ 5% a 37°C durante la noche en la preparación para el ensayo cAMP.

En la preparación para el ensayo, los compuestos 1 y 2 y OXM humano de tipo nativo se someten a dilución serial 3 veces en el Amortiguador de Ensayo del Compuesto (HBSS que contiene HEPES 20 mM y 1% de FBS inactivado con calor) por 10 concentraciones.

La placa celular se removió de la incubadora y el medio se removió por aspiración suave sin perturbar la célula de monocapa. Las células se trataron agregando 40 µl del Amortiguador de Ensayo Celular y 40 µl de la solución de prueba (es decir, Compuesto 1, Compuesto 2 u OXM humano de tipo silvestre diluido en el Amortiguador de Ensayo del Compuesto) en las placas celulares e incubando a temperatura ambiente por 1 hora con agitación suave.

Se midió la concentración de cAMP usando un kit de ensayo cAMP HTRF (Cisbio): se agregó conjugado cAMP-d2 en amortiguador de lisis celular (40 µl) seguido por el anticuerpo anti-cAMP-$Eu^{3+}$-Criptato, también en amortiguador de lisis celular (40 µl), a las células de la placa. El ensayo competitivo resultante se incubó por al menos 60 minutos a temperatura ambiente, después se detectó usando un instrumento Envision® PerkinElmer con excitación a 320 nm y emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades de visualización (emisión a 665nm/620nm*10000) son inversamente proporcionales a la cantidad de cAMP presente y se convierten a cAMP nM por pocillo usando una curva estándar cAMP.

La concentración de cAMP en cada pocillo (nM) se calculó usando una curva estándar cAMP y se convirtió a un porcentaje de la máxima respuesta observada con un conjugado análogo Gcg a un ácido graso C18 saturado (diácido) para ajuste de curva.

Se derivaron un valor $EC_{50}$ relativo y porcentaje superior (% $E_{máx}$) por análisis de regresión no lineal usando la respuesta de porcentaje máximo contra la concentración del péptido agregado, se ajustó por una ecuación logística de cuatro parámetros (software GraphPad Prism (versión 6.05).

Se calcularon $EC_{50}$ y % $E_{máx}$ para los Compuestos 1 y 2 y OXM humano de tipo silvestre esencialmente como se describe anteriormente. Los datos $EC_{50}$ y % $E_{máx}$ para estos compuestos se proporcionan en la Tabla 7. Además, los Compuestos 1 y 2 incrementan la producción cAMP en una manera dependiente de la dosis (datos no mostrados). El número de repeticiones (n) es indicado en paréntesis.

Tabla 7: $EC_{50}$ de los Compuestos 1 y 2 y OXM humano de tipo nativo en el hGcg-R en Hepatocitos Humanos Primarios

| **Compuesto** | **$EC_{50}$ (nM)** | **$E_{máx}$ (%)** |
|---|---|---|
| OXM humano tipo silvestre | 29.8 (n=1) | 90.0 |
| Compuesto 1 | 99.9 (n=1) | 100.0 |
| Compuesto 2 | 159.4(n=1) | 101.2 |

## FARMACOCINÉTICAS

### Farmacocinéticas en Monos Cinomólogos

Se demostraron las propiedades farmacocinéticas *in vivo* para compuestos de la presente invención usando monos cinomólogos.

Los compuestos se administraron por una dosis intravenosa o subcutánea única de 50 nmol/kg o 250 nmol/kg. Se recolectó sangre de cada animal a 4, 8, 12, 24, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 240, 288, 208, 480, 576 y 672 horas post-dosificación.

Las concentraciones de plasma de los compuestos se determinaron por un método LC/MS. Brevemente, un compuesto de la presente invención se extrajo de 100% de plasma de monos (25 µl) usando acetonitrilo. Se formaron dos distintas capas después de la centrifugación con el compuesto localizado en la capa líquida. Se transfirió 80 µl de alícuota del sobrenadante a una placa de 96 pocillos, diluida con 150 µl de agua y 25 µl de ácido fórmico. La muestra diluida (10 µl) se inyectó en una columna Supelco Analytical Discovery BIO Wide Porce C5-3, 5 cm X 1 mm, 3 µm. El efluente de la columna se dirige en un espectrómetro de masa Thermo Q-Exactive para detección y cuantificación.

En experimentos realizados esencialmente como se describe por este ensayo, se administró a monos cinomólogos una dosis subcutánea única (50 nmol/kg) del Compuesto 1 en HCl Tris 40 mM (pH 8.0) a un volumen de 0.20 ml/kg. Se recolectó sangre de cada animal a 2 (solamente IV), 7, 12,

24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576 y 672 horas post dosis.

Se administró a otros monos cinomólogos una dosis intravenosa (50 nmol/kg) o subcutánea (50 o 250 nmol/kg) del Compuesto 2 en HCl Tris 40 mM (pH 8.0) a un volumen de 0.20 ml/kg. Se recolectó sangre de cada animal a 2 (solamente IV), 7, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576 y 672 horas post dosis.

Los datos para el Compuesto 1 se proporcionaron en la Tabla 9 y los datos para el Compuesto 2 se proporcionaron en la Tabla 10.

El Compuesto 1 alcanzó concentraciones de plasma máximas medias a aproximadamente 12 horas después de la dosis subcutánea 50 nmol/kg. La vida útil media es 57 horas y la separación media es 2.16 ml/hora/kg (Tabla 8).

El compuesto 2 alcanzó concentraciones de plasma máximas medias aproximadamente 24 horas después de la dosis subcutánea de 50 nmol/kg. La vida útil media es 122 horas y la separación media es 0.55 ml/hora/kg (Tabla 9).

Tabla 8: Parámetros de farmacocinética media e individual después de una dosis subcutánea de 50 nmol/kg del Compuesto 1 a monos cinomólogos machos

| Compuesto | ID animal | $T_{1/2}$ (hora) | $T_{máx}$ (hora) | $C_{máx}$ (nmol/L) | $AUC_{0-inf}$ (h*nmol/L) | CL/F (ml/h/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto 1:SC 50nmol/kg | 107762 | 47 | 12 | 253 | 21672 | 2.31 |
| | 107763 | 67 | 12 | 236 | 24865 | 2.01 |
| | Media | 57 | 12 | 244 | 23268 | 2.16 |

Abreviaturas: $AUC_{0-inf}$ = área bajo la curva de 0 a infinito, CL/F = separación/biodisponibilidad, $T_{máx}$ = tiempo para concentración máxima, $C_{máx}$ = concentración de plasma máxima, $T_{1/2}$ = vida útil.

Tabla 9: Parámetros de farmacocinética media e individual del Compuesto 2 después de una dosis intravenosa o subcutánea única a monos cinomólogos macho

| Compuesto/Ruta/Dosis | ID Animal | $T_{1/2}$ (hora) | $T_{máx}$ (hora) | $C_0$ o $C_{máx}$ (nmol/L) | $AUC_{0-inf}$ (hr*nmol/L) | CL/F (ml/hr/kg) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Compuesto 2: IV /50nmol/kg | 107772 | 88 | NA | 1017 | 94828 | 0.53 |
| | 107773 | 131 | NA | 1105 | 93174 | 0.54 |
| | Media | 110 | NA | 1061 | 94001 | 0.53 |
| Compuesto 2: SC/50nmol/kg | 107764 | 137 | 24 | 474 | 100967 | 0.50 |
| | 107765 | 106 | 24 | 452 | 82792 | 0.60 |
| | Media | 122 | 24 | 463 | 91879 | 0.55 |
| Compuesto 2:SC 250nmol/kg | 107766 | 115 | 12 | 3640 | 429859 | 0.58 |
| | 107766 | 104 | 12 | 3615 | 540175 | 0.46 |
| | media | 110 | 12 | 3628 | 485017 | 0.52 |

Abreviaturas: $AUC_{0-inf}$= área bajo la curva de 0 a infinito, CL=separación, CL/F=separación/biodisponibilidad, $T_{máx}$=tiempo para máxima concentración, $C_0$=concentración extrapolada al tiempo 0 hora, $C_{máx}$= máxima concentración de plasma, $T_{1/2}$=vida útil, NA= no aplicable.

**ESTUDIOS *IN VIVO***

Prueba de Tolerancia a Glucosa Oral (OGTT) en

ratones DIO

El modelo de ratón (DIO) obeso inducido con dieta es un modelo de resistencia a la insulina. Ratones DIO machos de cinco a seis meses de edad (C57BL/6) de Taconic Biosciences se usaron en este estudio. Los animales son alojados individualmente en una instalación a temperatura controlada (24°C) con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (luz a 06:00) y acceso libre a alimento y agua. El periodo de aclimatación a la instalación es de dos semanas. Esa misma tarde, los animales se mantienen en ayunas en jaulas limpias y se dosificaron con el vehículo (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0) o artículos de prueba por inyección subcutánea. La siguiente mañana, 16 horas después de la inyección del péptido, se obtuvieron los pesos corporales en ayunas para calcular la dosis de glucosa. Se tomaron muestras de sangre para medir la glucosa en tiempo cero. Entonces se proporciona a los animales por sonda oral de glucosa (2 g/kg). Se obtuvieron dos lecturas de glucosa mediante glucómetros a 15, 30, 60 y 120 minutos después de glucosa oral. Se reportó el promedio de dos lecturas de glucosa en cada punto de tiempo y se calculó un área bajo la curva. Se analizaron estadísticas usando ANOVA con comparación de Dunnett por JMP 6; la significancia se denota a $p \leq 0.05$ contra vehículo.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto 2 muestra una

disminución dependiente de la dosis en glucosa durante la prueba de tolerancia, y el AUC de glucosa disminuyó en todas las tres dosis probadas 1, 3 y 10 nmol/kg (Tabla 10).

Tabla 10: AUC en glucosa de ratones DIO machos tratados con el Compuesto 2 y semaglutida en respuesta a un OGTT (2g/kg)

| **Compuesto** | **Dosis (nmol/kg)** | **AUC en Glucosa (% de vehículo)** |
|---|---|---|
| Compuesto 2 | 1 | 76* |
| Compuesto 2 | 3 | 50* |
| Compuesto 2 | 10 | 39* |
| Semaglutida | 1 | 59* |
| Semaglutida | 3 | 51* |
| Semaglutida | 10 | 38* |

% de vehículo calculado como 100 x (Valor calculado para el grupo del compuesto/valor calculado para el grupo vehículo) *$p \leq 0.05$.

<u>OGTT en Ratones DIO tratados con Estreptozotocina (STZ)</u>

El modelo de ratón tratado con STZ es un modelo para diabetes temprana. Ratones DIO machos de cinco o seis meses de edad (C57BL6) de Taconic Biosciences se usaron en este estudio. Los animales se alojaron individualmente en una instalación de temperatura controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz a 6:00), y libre acceso a

alimento y agua. Después de dos semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se inyectaron intraperitonealmente con 50 mg/kg de STZ el martes y viernes. Dos semanas después de la inyección, los animales con niveles de glucosa entre 180-300 mg/dl a las 9:00 se seleccionaron para el estudio OGTT. El día anterior al estudio, los animales se aleatorizaron en grupos a base del peso corporal y sus niveles de glucosa. Los animales se trataron con el vehículo o artículos de prueba por inyección subcutánea justo antes de remover el alimento durante la noche (16:00). En la siguiente mañana a las 08:00, 16 horas después de la inyección del compuesto, se tomaron muestras de sangre para medir la glucosa en el tiempo cero. Se proporciona a los animales una dosis oral de glucosa de 2 g/kg. La glucosa se midió 15, 30, 60 y 120 minutos después de la estimulación de glucosa oral. Se analizaron las estadísticas usando ANOVA con comparación de Dunnett por JMP 6. La significancia es indicada a $p \leq 0.05$ contra el vehículo.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, el Compuesto 2 muestra una disminución dependiente de la dosis en excursión de glucosa durante la prueba de tolerancia. El AUC en glucosa disminuyó en todas las tres dosis probadas, 1, 3 y 10 nmol/kg (Tabla 11).

Tabla 11: AUC en Glucosa de ratones STZ machos tratados con el Compuesto 2 y semaglutida en respuesta a un OGTT (2g/kg)

| **Compuesto** | **Dosis (nmol/kg)** | **AUC en Glucosa (% de vehículo)** |
|---|---|---|
| Compuesto 2 | 1 | 70* |
| Compuesto 2 | 3 | 48* |
| Compuesto 2 | 10 | 35* |
| Semaglutida | 1 | 72* |
| Semaglutida | 3 | 53* |
| Semaglutida | 10 | 35* |

% de vehículo calculado como 100 x (Valor calculado para el grupo del compuesto/valor calculado para el grupo vehículo) *$p \leq 0.05$.

Control Glicémico en Ratones DIO

Se usaron ratones DIO de cinco a seis meses de edad (C57BL/6) de Taconic Biosciences en este estudio. Los animales se alojaron individualmente en una instalación con temperatura controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz a las 6:00), y acceso libre a alimento y

agua. Después de dos semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento (n=7/grupo) en base a su peso corporal y glucosa en sangre. Se inyectaron los ratones subcutáneamente una vez con el vehículo o compuestos (25 nmol/kg). La glucosa en sangre se monitoreó 2 y 8 horas post-inyección y después una vez al día a las 8:00 por 4 días. Se realizaron las OGTT a las 44 y 78 horas post inyección del péptido. Se analizaron las estadísticas usando ANOVA con comparación de Dunnett por JMP 6. La significancia se denota a $p \leq 0.05$ contra vehículo.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, los ratones tratados con el Compuesto 2 y Compuesto 4 tienen glucosa menor que los controles de vehículo hasta 96 horas post inyección. Los ratones tratados con el Compuesto 2 y Compuesto 4 tienen excursiones de glucosa inferior post estimulación con glucosa oral en ambos puntos de tiempo cuando se realizó el OGTT.

El compuesto 1 y compuesto 4 disminuyen la glucosa en sangre por hasta 72 horas (Tabla 12). Los ratones tratados con el compuesto 1 y compuesto 3 tienen excursiones de glucosa inferiores post estimulación de glucosa oral a 44 horas post inyección de péptido (Tabla 13).

Tabla 12: Medición de glucosa en sangre a 2, 8, 24, 72 y 96 horas post-inyección en ratones DIO machos

| Tiempo | Glucosa en sangre (mg/dL) post-inyección del vehículo | | Glucosa en sangre (mg/dL) post-inyección del Compuesto 1 | | Glucosa en sangre (mg/dL) post-inyección del Compuesto 1 | | Glucosa en sangre (mg/dL) post-inyección del Compuesto 3 | | Glucosa en sangre (mg/dL) post-inyección del Compuesto 4 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Media | SEM | Media | SEM | Media | SEM | Media | SEM | Media | SEM |
| 2 | 155.7 | 5.0 | 168.5 | 21.4 | 112.7 | 8.5 | 173.4 | 19.0 | 110.2 | 2.3 |
| 8 | 164.5 | 6.7 | 79.4 | 3.4 | 87.4 | 1.2 | 81.4 | 3.8 | 91.5 | 4.4 |
| 24 | 189.1 | 5.1 | 90.6 | 4.0 | 101.1 | 3.1 | 96.6 | 2.8 | 87.4 | 1.6 |
| 48 | 142.6 | 2.5 | 101.9 | 4.1 | 101.3 | 3.1 | 95.8 | 5.3 | 102.9 | 4.7 |
| 72 | 154.2 | 4.2 | 113.4 | 5.6 | 97.6 | 3.8 | 104.7 | 5.6 | 115.7 | 2.8 |
| 96 | 159.4 | 4.3 | 150.0 | 10.4 | 115.0 | 5.5 | 141.1 | 7.2 | 104.6 | 2.6 |

Tabla 13: Excursión de glucosa durante OGTT a 44 horas y 78 horas post-inyección del compuesto

| Compuesto | 44 horas | 78 horas |
|---|---|---|
| | AUC en glucosa (% de vehículo) | AUC en glucosa (% del vehículo) |
| Compuesto 1 | 42* | 90 |
| Compuesto 2 | 39* | 66* |
| Compuesto 3 | 35* | 76* |
| Compuesto 4 | 41* | 60* |

% de vehículo calculado como 100 x (Valor calculado para el grupo del compuesto/valor calculado para el grupo vehículo) *p $\leq$ 0.05.

Tratamiento crónico en Ratones DIO

Se evaluaron los efectos en ingesta de alimento y peso corporal/grasa en ratones DIO. Se usaron ratones DIO (C57BL/6) de cinco a seis meses de edad de Taconic Biosciences en este estudio. Los animales se alojaron individualmente en una instalación con temperatura controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz a 6:00), y acceso libre a alimento y agua. Los ratones se aclimataron a la instalación por dos semanas. El día antes del inicio del estudio, se midió la masa de grasa por resonancia magnética nuclear (NMR) usando un instrumento Echo Medical System (Houston, TX). Los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento (N= 7/grupo) en base al peso corporal y masa de grasa de modo que cada grupo tiene un peso corporal y masa de grasa media de partida. Se administraron el vehículo (Tris-HCl 40mM, pH 8.0), compuestos de prueba, o un semaglutida como control positivo por inyección subcutánea (SC) a los ratones *ad libitum* entre 8-10 am cada tres días por 15 días. Se hicieron inyecciones Sc en los Días 1, 4, 7, 10 y 13. Se midieron el peso corporal e ingesta de alimento justo antes de cada inyección a través del estudio. Se

calcularon los cambios en porcentaje del peso corporal como sigue:

$$\frac{100 \times (\text{peso corporal final del animal} - \text{peso corporal inicial del animal})}{\text{Peso corporal inicial del animal}}$$

Al término del estudio, se midió nuevamente la grasa total por NMR. Se analizaron las estadísticas usando ANOVA con comparación de Dunnett por JMP 6. La significancia se indicó a $p \leq 0.05$ contra vehículo.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, los Compuestos 1-4 reducen la ingesta de alimento y peso corporal/grasa como se muestra en la Tabla 14 abajo:

Tabla 14: % De cambio de peso corporal y % de cambio de grasa corporal en ratones DIO

| Compuesto | Dosis (nmol/kg) | Peso Corporal (% de cambio contra vehículo del Día 1) | Grasa Corporal (% de cambio contra vehículo del Día 1) |
|---|---|---|---|
| Compuesto 1 | 15 | -19* | -49* |
| | 30 | -29* | -66* |
| Compuesto 2 | 15 | -19* | -43* |
| | 30 | -33* | -70* |
| Compuesto 3 | 15 | -17* | -32* |
| | 30 | -37* | -67* |
| Compuesto 4 | 15 | -15* | -26* |
| | 30 | -39* | -69* |
| Semaglutida | 30 | -8 | -20* |
| | 60 | -12* | -29* |

* $p \leq 0.05$

Tratamiento Agudo en Ratones DIO

Para investigar las trayectorias metabólicas involucradas con el tratamiento de los compuestos de la presente invención independiente a la pérdida de peso, los compuestos se probaron en ratones DIO (C57BL/6) intensamente. Los ratones usados con de tres a cuatro meses de edad en una dieta alta en grasa por al menos 4 semanas. Los animales son individualmente alojados en una instalación con temperatura controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luz a las 6:00), y acceso libre a alimento y agua. Se administraron el vehículo o compuestos de prueba a los ratones por inyección subcutánea a las 16:00 del día antes al día de estudio. Los animales se sacrificaron 16 horas más tarde para recolectar sangre mediante punción cardiaca. Las estadísticas se analizaron usando ANOVA con comparación de Dunnett por JMP-6. La significancia se indicó a $p \leq 0.05$ contra el vehículo.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en el ensayo. Los compuestos 1-3 disminuyen el colesterol en suero y niveles PCSK9 e incrementa los niveles de FGF-21 como se muestra en la Tabla 15. En contraste, el tratamiento con semaglutida no disminuye el colesterol en suero y niveles de PCSK9 e incrementa los niveles de FGF-21. La ingesta de alimento disminuye a un nivel similar en todos

los grupos de tratamiento, lo cual indica que los cambios en colesterol, PCSK9 y FGF-21 son independientes en ingesta de alimento.

Tabla 15: Efectos agudos en niveles de PCSK9, FGF-21 y Colesterol

| Compuesto | Dosis (nmol/kg) | PCSK9 (% de vehículo) | FGF-21 (% de vehículo) | Colesterol (% de vehículo) |
|---|---|---|---|---|
| Compuesto 1 | 30 | 14.6* | 1770* | 60.9* |
| Compuesto 2 | 30 | 12.8* | 465* | 80.6* |
| Compuesto 3 | 30 | 15.6* | 1124* | 55.6* |
| Semaglutida | 30 | 115.3 | 75 | 117.6 |

% de vehículo calculado como 100 x (Valor calculado para el grupo del compuesto/valor calculado para el grupo vehículo) *$p \leq 0.05$.

Efectos en el Gasto de Energía en ratones DIO

Ratones macho DIO (C57BL/6) de siete a ocho meses de edad (C57BL/6) que pesan 45-50g son usados en este estudio para evaluar el efecto de los compuestos de la presente invención en el metabolismo de energía. Los animales son alojados individualmente en una instalación de temperatura

controlada (24°C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas 22:00), y libre acceso a alimento (TD95217)(Teklad) y agua. Después de 2 semanas de aclimatación en la instalación, los ratones son aleatorizados a grupos de tratamiento (N=6/grupo) con base en el peso corporal de manera que cada grupo tiene peso corporal medio de partida similar. Los animales son colocados en un calorímetro PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Chesterfield, MO) por 8 días de aclimatación. El vehículo (40 mM de amortiguador Tris HCl a pH 8.0, 10 ml/kg), artículo de prueba (15 nmol/kg) o semaglutida (60 nmol/kg) son simultáneamente administrados a ratones DIO alimentos *ad libitum* 30-90 minutos previo al comienzo del ciclo de oscuridad cada tres días por 15 días.

Los cocientes de calor y respiratorio (RER) son medidos por calorimetría indirecta como se describe usando un sistema de calorimetría de circuito abierto. RER es la relación del volumen de $CO_2$ producido ($Vco_2$) al volumen de $O_2$ consumido ($Vo_2$). El calor se calcula con peso corporal delgado considerado. El gasto de energía es kcal/kg/3 día y se expresa como media ± SEM de 6 ratones por grupo. La significancia estadística es evaluada por ANOVA de dos vías seguido por la prueba de comparación múltiple Tukey.

En los experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, los ratones tratados con los

Compuestos 1 y 2 incrementan su velocidad metabólica partiendo de la Semana 2 y sostienen el efecto a través del periodo de tratamiento como se muestra en la Tabla 16. Sin embargo, la semaglutida no tiene efecto en la velocidad metabólica. Este incremento en la velocidad metabólica puede contribuir a la pérdida de peso adicional observada con la administración de los Compuestos 1 y 2 en comparación con la administración de semaglútida.

Tabla 16: Efecto de tratamiento crónico con el Compuesto 1, Compuesto 2 o semaglútida en rata metabólica en ratones DIO

| | **Calor cumulativo (Kcal/kg de masa delgada/3 día)** | | | |
|---|---|---|---|---|
| **Periodo de tratamiento** | **Vehículo** | **Semaglutida** | **Compuesto 1** | **Compuesto 2** |
| **Día 1 hasta Día 4** | 2184 ± 27 | 1973 ± 51 | 1749 ± 136** | 1746 ± 96** |
| **Día 4 hasta Día 7** | 2154 ± 36 | 2018 ± 54 | 1822 ± 173 | 1778 ± 132* |
| **Día 7 hasta Día 10** | 2239 ± 28 | 2151 ± 48 | 2349 ± 129 | 2549 ± 129** |
| **Día 10 hasta Día 13** | 2207 ± 16 | 2138 ± 46 | 2351 ± 144 | 2568 ± 147* |

* $p \leq 0.05$ contra vehículo

** $p \leq 0.05$ contra semaglútida.

**SECUENCIAS DE AMINOÁCIDO**

**SEQ ID NO: 1 (OXM humana)**

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala

(HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA)

**SEQ ID NO: 2 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Xaa28 es Glu (E) o Ser (S);

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral

Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado.

**SEQ ID NO: 3 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado.

**SEQ ID NO: 4 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con un ácido graso C14-C24 mediante (i) un enlace directo

o (ii) un enlazador entre la Lys en la posición 20 y el ácido graso C14-C24; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado.

**SEQ ID NO: 5 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)_{16}CO_2H$; y

el aminoácido C-terminal es amidado.

**SEQ ID NO: 6 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)-CO-$(CH_2)_{18}CO_2H$; y

el aminoácido C-terminal es amidado.

**SEQ ID NO: 7 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_2$-CO-$(CH_2)_{16}CO_2H$; y

el aminoácido C-terminal es amidado.

**SEQ ID NO: 8 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Lys en la posición 20 es químicamente modificado por conjugación del grupo épsilon-amino de la cadena lateral Lys con ([2-(2-aminoetoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γ-Glu)$_2$-CO-$(CH_2)_{18}CO_2H$; y

el aminoácido C-terminal es amidado.

**SEQ ID NO: 9 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-

Xaa28-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLXaa28GGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib;

Xaa28 es Glu (E) o Ser (S); y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado.

**SEQ ID NO: 10 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Glu-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLEGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado.

**SEQ ID NO: 11 (Secuencia Artificial)**

His-Xaa2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Lys-Lys-Ala-Lys-Glu-Phe-Val-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser-Ser-Gly

(HXaa2QGTFTSDYSKYLDEKKAKEFVEWLLSGGPSSG)

en donde Xaa2 es Aib; y

el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado.