



(43) International Publication Date
14 July 2016 (14.07.2016)

(10) International Publication Number
WO 2016/111971 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 14/575 (2006.01) *A61K 38/26* (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2016/012124

(22) International Filing Date:

5 January 2016 (05.01.2016)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

62/101,488 9 January 2015 (09.01.2015) US

(71) Applicant: **ELI LILLY AND COMPANY** [US/US];
Lilly Corporate Center, Indianapolis, Indiana 46285 (US).

(72) Inventors: **ALSINA-FERNANDEZ, Jorge**; c/o Eli Lilly
and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana
46206-6288 (US). **BOKVIST, Bengt Krister**; c/o Eli Lilly
and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana
46206-6288 (US). **COSKUN, Tamer**; c/o Eli Lilly and
Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-
6288 (US). **CUMMINS, Robert Chadwick**; c/o Eli Lilly
and Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana
46206-6288 (US).

(74) Agents: **MARTINEZ, Alejandro** et al.; Eli Lilly and
Company, P.O. Box 6288, Indianapolis, Indiana 46206-
6288 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR,
KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG,
MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM,
PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC,
SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ,
TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU,
TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU,
LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

- as to applicant's entitlement to apply for and be granted a
patent (Rule 4.17(ii))
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the
earlier application (Rule 4.17(iii))

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))



WO 2016/111971 A1

(54) Title: GIP AND GLP-1 CO-AGONIST COMPOUNDS

(57) Abstract: The present invention relates to dual incretin peptide mimetic compounds that agonize receptors for both human glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1), and may be useful for treating type 2 diabetes mellitus (T2D).

Listado de secuencias
SEQUENCE LISTING

<110> Eli Lilly and Company

<120> GIP AND GLP-1 CO-AGONIST COMPOUNDS

<130> X20448

<150> 62/101488

<151> 2015-01-09

<160> 11

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
1 5 10 15

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
20 25 30

Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
35 40

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

Listado de secuencias

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
 the epsilon-amino group of the K side-chain with
 ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2
 H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 3

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 4
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

Listado de secuencias

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
 the epsilon-amino group of the K side-chain with
 ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)18-CO2
 H

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 4

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 5
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

Listado de secuencias

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Aib

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20)..(20)
 <223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with
 ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)16-CO2
 H

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39)..(39)
 <223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 5

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 6
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Synthetic Construct

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Aib

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid

Listado de secuencias

2-Aminoisobutyric Acid

```

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Aib

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to
the epsilon-amino group of the K side-chain with
([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)16-CO2
H

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 6

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic Construct

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Aib

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)

```

Listado de secuencias

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with
[2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)18-CO2H

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 7

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
 1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Phe Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 8

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
 2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

Listado de secuencias

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)16-CO2 H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 8

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 9

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

Listado de secuencias

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)2-CO-(CH2)16-CO2 H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 9

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 10

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

Listado de secuencias

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)2-(gamma-Glu)1-CO-(CH2)18-CO2 H

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is amidated as a C-terminal primary amide

<400> 10

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Xaa Leu Asp Lys
1 5 10 15

Ile Ala Gln Lys Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 11

<211> 39

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa at position 2 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(2)

<223> Aib

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa at position 13 is nonnaturally occurring amino acid
2-Aminoisobutyric Acid

<220>

<221> MOD_RES

<222> (13)..(13)

<223> Aib

<220>

<221> MOD_RES

<222> (20)..(20)

Listado de secuencias

<223> Lys at position 20 is chemically modified through conjugation to the epsilon-amino group of the K side-chain with ([2-(2-Amino-ethoxy)-ethoxy]-acetyl)²-(gamma-Glu)^a-CO-(CH₂)^b-CO₂H wherein a is 1 to 2 and b is 10 to 20

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa at position 22 is either Phe or 1-Nal

<220>

<221> MOD_RES

<222> (39)..(39)

<223> Ser at position 39 is optionally amidated as a C-terminal primary amide

<400> 11

Tyr	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Xaa	Leu	Asp	Lys
1				5					10					15	

Ile	Ala	Gln	Lys	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35			

COMPUESTOS CO-AGONISTAS DE GIP Y GLP-1

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de
5 medicina. Más particularmente, la presente invención se refiere
a compuestos miméticos del péptido de incretina dual que
agoniza los receptores para tanto el polipéptido
insulínico dependiente de la glucosa humana (GIP) y
péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), y pueden ser útiles para
10 tratar diabetes mellitus tipo 2 (T2D).

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La T2D 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
15 causados por resistencia a la insulina. La corriente estándar
de cuidado para T2D incluye dieta y ejercicio junto con
fármacos de reducción de glucosa inyectable y oral disponible.
No obstante, muchos pacientes con T2D todavía permanecen
inadecuadamente controlados. Los miméticos de incretina
20 actualmente comercializados o inhibidores de dipeptidil
peptidasa IV (DDP-IV) solamente utilizan un mecanismo de acción
establecido único para control glicémico. Un compuesto para
T2D es necesario que utilice un mecanismo de acción dual.

El GIP es un péptido regulador gastrointestinal de
25 42 aminoácidos que juega un papel fisiológico en la homeostasis

de glucosa estimulando la secreción de insulina a partir de células beta pancreáticas en la presencia de glucosa y protección de células betas pancreáticas. El GLP-1 es un péptido de 37 aminoácidos que estimula la secreción de insulina, protege las células beta pancreáticas, e inhibe la secreción de glucagón, vacío gástrico y absorción de alimento el cual conduce a la pérdida de peso. El GIP y GLP-1 se conocen como incretinas; la señalización del receptor de incretina ejerce acción fisiológicamente relevante crítica para la homeostasis de glucosa. En fisiología normal, el GIP y GLP-1 son secretados a partir del intestino después de la comida, y estas incretinas mejoran la respuesta fisiológica al alimento incluyendo sensación de saciedad, secreción de insulina, y disposición de nutriente. Los pacientes con T2D tienen respuestas de incretina alterada.

La dosificación de los análogos de GLP-1 se han encontrado por ser limitados por efectos adversos, tales como náuseas y vómito, y como una consecuencia la dosificación muy a menudo no puede alcanzar la eficacia completa para el control glicémico y pérdida de peso. El GIP solo tiene disponibilidad de reducción a la glucosa muy modesta en humanos diabéticos tipo 2. Los GIP tanto nativos como GLP-1 son inactivados rápidamente por la proteasa ubicua, DPP IV, y por lo tanto, pueden solamente ser usados para control metabólico de corto plazo.

El Glucacón es un péptido de 29 aminoácidos producido por el páncreas, y cuando se une al receptor de glucagón, señala al hígado para liberar la glucosa que conduce a un incremento en la glucosa en sangre. El GLP-2, un péptido que es similar al GLP-1 se produce a partir del procesamiento del proglucagón, conocido por estar asociado con la proliferación celular en el intestino. De este modo, la estimulación del glucagón y receptores de GLP-2 debe ser minimizada durante el tratamiento crónico de pacientes con T2D con el fin de maximizar la disminución de glucosa y reducir el potencial de riesgos carcinogénicos a largo plazo.

Ciertos análogos de GIP han sido descritos por presentar actividad tanto de GIP como de GLP-1 en los documentos WO 2013/164483, WO 2014/192284, y WO 2011/119657.

La DPP IV está en la clase de expopeptidasa de enzimas proteolíticas. La introducción de aminoácidos no naturales en una secuencia puede incrementar la estabilidad proteolítica de cualquier péptido dado. Mientras el uso de aminoácidos no naturales puede ayudar con la estabilidad de los péptidos contra la proteólisis de DPP IV y otras formas de degradación, se descubrió por los Solicitantes como parte de la presente invención, que los aminoácidos no naturales pueden tener efectos inesperados en el equilibrio de la actividad agonista entre GIP y GLP-1. Los aminoácidos no naturales también incrementan la probabilidad de que un péptido pueda ser visto

como extraño y establecer reacciones inmunes indeseables, tales como, inmunogenicidad humana y reacciones del sitio de inyección.

Los ácidos grasos, a través de sus porciones de unión
5 a albúmina, pueden mejorar las farmacocinéticas de un péptido por extensión de la vida media, por ejemplo. Mientras el uso de ácidos grasos puede mejorar la vida media del péptido, se descubrió por los Solicitantes como parte de la presente invención, que la longitud, composición y colocación de la
10 cadena de ácido graso y el enlazador entre el péptido y la cadena de ácido graso, pueden tener efectos inesperados en el equilibrio de la actividad agonista de GIP y GLP-1.

La tolerabilidad de ciertos análogos de GLP-1 se ha encontrado por prevenir una dosis del análogo de GLP-1 que
15 alcanza mejor eficacia para el control glicémico y pérdida de peso. Los efectos secundarios más comunes asignados a los análogos de GLP-1 son náuseas y vómito, pero algunos compuestos también pueden impactar la frecuencia cardíaca. El eje HPA es parte de la respuesta al estrés fisiológico y el GLP-1 se
20 encontró por estimular el eje HPA en ratas, resultando en los niveles incrementados de corticosterona proporcionando un enlace potencial para eventos adversos tales como frecuencia cardíaca incrementada. Como parte de la presente invención, los solicitantes encontraron inesperadamente, que un compuesto
25 de la presente invención no conducen a niveles elevados como

se observan con semaglutida en un modelo de rata y así posiblemente puede ser dosificado a niveles de eficacia superior que los agentes selectivos de GLP-1R.

Permanece una necesidad de proporcionar un compuesto
5 que es un co-agonista equilibrado de receptores GIP y GLP-1, pero es selectivo contra los receptores del glucagón y GLP-2 relacionados. También, permanece una necesidad de proporcionar un compuesto con actividad co-agonista equilibrada de receptores GIP y GLP-1, los cuales puedan proporcionar pérdida
10 de peso dada la actividad encontrada en modelos animales. Adicionalmente, permanece una necesidad para proporcionar un compuesto con actividad co-agonista equilibrada de receptores GIP y GLP-1 que suministran estabilidad adecuada contra DPP IV y otras formas de degradación, pero mientras todavía mantienen
15 un potencial de inmunogenicidad bajo. También, permanece una necesidad de proporcionar un compuesto con actividad co-agonista equilibrada de receptores GIP y GLP-1 que soportan la dosificación potencial una vez a la semana en humanos.

Por consiguiente, ciertos compuestos de la presente
20 invención tienen potencial inferior para inmunogenicidad y reacciones del sitio de inyección que ciertos compuestos co-agonistas de GIP-GLP-1 en la técnica. Ciertos compuestos de la presente invención tienen potencial para producir pérdida de peso en pacientes con base en los datos de gasto de energía
25 animal. Además, ciertos compuestos de la presente invención

5 tienen una actividad co-agonista equilibrada contra los receptores GIP y GLP-1 y selectividad contra receptores tanto de glucagón como GLP-2, potencial de baja inmunogenicidad, y características de farmacocinética (PK) que soportan la dosificación una vez a la semana en humanos.

Por consiguiente, una modalidad de la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I:



10 en donde X_1 es Aib; X_2 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 $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ en donde a es 1 a 2 y b es 10 a 20; X_3 es Phe o 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ
15 ID NO: 11), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I,

20 en donde X_1 es Aib; X_2 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 $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ en donde a es 1 a 2 y b es 10 a 18; X_3 es Phe; y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

25 En una modalidad adicional, la presente invención

proporciona un compuesto de Fórmula I, en donde X_1 es Aib; X_2 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 $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ en donde a es 1 a 2 y b es 10 a 18; X_3 es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, en donde X_1 es Aib; X_2 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 $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ en donde a es 1 a 2 y b es 14 a 18; X_3 es Phe o 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto en donde b es 16 a 18. Adicionalmente, la presente invención proporciona un compuesto en donde b es 18.

En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, en donde X_1 es Aib; X_2 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 $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-}$

CO₂H en donde a es 1 y b es 10 a 18; X₃ es Phe o 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

5 En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de Fórmula I, en donde X₁ es Aib; X₂ 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)_a-CO-(CH₂)_b-
10 CO₂H en donde a es 2 y b es 10 a 18; X₃ es Phe o 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

 En una modalidad adicional, la presente invención
15 proporciona un compuesto de Fórmula I, en donde X₁ es Aib; X₂ 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)_a-CO-(CH₂)_b-
CO₂H en donde a es 1 a 2 y b es 10 a 18; X₃ es Phe o 1-Nal; y
20 el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

 En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula:
YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS;

25 en donde X₁ es Aib; X₂ 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)-
 etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; y el aminoácido C-
 terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ
 5 ID NO: 3), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona
 un compuesto de la Fórmula:
 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS;

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en la posición 20 es
 10 químicamente modificado a través de la conjugación al grupo
 épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
 etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el
 aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-
 terminal (SEQ ID NO: 4), o una sal del mismo farmacéuticamente
 15 aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona
 un compuesto de la Fórmula:

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS;

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en la posición 20 es
 20 químicamente modificado a través de la conjugación al grupo
 épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
 etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; y el aminoácido C-
 terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID
 NO: 5), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

25 En una modalidad, la presente invención proporciona

un compuesto de la Fórmula:

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS};$

en donde X_1 es Aib; X_2 es Aib; K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo
 5 épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{16}\text{-CO}_2\text{H}$; y el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona
 10 un compuesto de la Fórmula:

$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS}$

en donde X_1 es Aib; X_2 es Aib; K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo
 15 épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_2\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-CO}_2\text{H}$; y el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula:

20 $\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQKAX}_3\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS}$

en donde X_1 es Aib; X_2 es Aib; K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo
 25 épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_1\text{-CO}-(\text{CH}_2)_{16}\text{-CO}_2\text{H}$; X_3 es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-

terminal (SEQ ID NO: 8), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula:

5 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ 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-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el
10 aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 9), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la Fórmula:

15 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ 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-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el
20 aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 10), o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la presente
25 invención con un portador, diluyente, o excipiente

farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes mellitus tipo 2, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un método para tratar diabetes mellitus tipo 2 que comprende además, administrar simultáneamente, separadamente, o secuencialmente en combinación con una cantidad efectiva de uno o más agentes seleccionados a partir de metformina, tiazolidindionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil peptidasa 4, y co-transportadores de glucosa en sodio.

En una modalidad, la presente invención proporciona un método para mejorar el control glicémico en adultos con diabetes mellitus tipo 2, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención como un adjunto a la dieta y ejercicio. En una modalidad, la presente invención proporciona un método para el manejo de peso crónico en adultos con un índice de masa corporal inicial ≥ 27 y diabetes mellitus tipo 2, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención como un adjunto a una dieta calórica reducida y actividad física incrementada.

En una modalidad, la presente invención proporciona

un método para tratar síndrome metabólico, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un
5 método para tratar dislipidemia, obesidad, y/o estatosis hepática asociada con resistencia a la insulina y diabetes, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método
10 para tratar fragilidad o incremento de la fuerza ósea, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención.

En una modalidad, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en terapia. En
15 una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención para uso en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2. En una modalidad adicional, la presente invención proporciona un compuesto de la presente invención en combinación simultánea, separada, o secuencial
20 con uno o más agentes seleccionados a partir de metformina, tiazolidindionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil peptidasa 4, y co-transportadores de glucosa en sodio para uso en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2.

En una modalidad, la presente invención proporciona
25 un compuesto de la presente invención para uso en el control

glicémico en adultos con diabetes mellitus tipo 2 como un
adjunto a la dieta y ejercicio. En una modalidad, la presente
invención proporciona un compuesto de la presente invención
para uso en manejo de peso crónico en adultos con un índice de
5 masa corporal inicial ≥ 27 y diabetes mellitus tipo 2 como un
adjunto a una dieta calórica reducida y actividad física
incrementada.

En una modalidad, la presente invención proporciona
el uso de un compuesto de la presente invención para la
10 manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes
mellitus tipo 2. En una modalidad adicional, la presente
invención proporciona el uso de un compuesto de la presente
invención en combinación simultánea, separada, o secuencial
con uno o más agentes seleccionados a partir de metformina,
15 tiazolidindionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil
peptidasa 4, y co-transportadores de glucosa en sodio para la
manufactura de un medicamento para el tratamiento de diabetes
mellitus tipo 2.

La presente invención proporciona compuestos que
20 presenta actividad equilibrada de GIP y GLP-1. La actividad
equilibrada contra GIP y GLP-1 como se usa en la presente, se
refiere a un compuesto que tiene afinidad para los receptores
GIP y receptores GLP-1 en un ensayo de unión *in vitro* a una
relación molar que es cercana a 1:1, tal como 1:1 GLP-1/GIP,
25 2:1 GLP-1/GIP, 3:2 GLP-1/GIP, 1:2 GLP-1/GIP, o 2:3 GLP-1/GIP.

La presente invención proporciona compuestos que presentan selectividad para receptores GIP y GLP-1 contra los receptores para glucagón y GLP-2. El término "selectividad" o "selectivo contra", cuando se usan en la presente para
5 referencia a la actividad de GIP y GLP-1 en comparación con la actividad del glucagón, se refieren a un compuesto que presenta 1000-, 500-, o aproximadamente 100-veces potencia superior para GIP y GLP-1 sobre el glucagón cuando los datos son normalizados a partir de los ensayos de unión *in vitro* respectivos. El
10 término "selectividad" o "selectivo contra", cuando se usan en la presente para referencia a la actividad de GIP y GLP-1 en comparación con la actividad de GLP-2, se refiere a un compuesto que presenta 250-, 200-, 100-, o aproximadamente 50-veces potencia superior para GIP y GLP-1 sobre GLP-2 cuando
15 los datos son normalizados a partir de los ensayos funcionales *in vitro* respectivos.

La presente invención proporciona un método para el tratamiento de diabetes tipo 2 en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento, una
20 cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable. La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de diabetes tipo 2 en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal tratamiento, una cantidad efectiva
25 de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo

farmacéuticamente aceptable, en donde la administración es subcutánea. La presente invención también proporciona un método para el tratamiento de diabetes tipo 2 en un paciente que comprende administrar a un paciente en necesidad de tal
5 tratamiento, una cantidad efectiva de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable, y simultáneamente, separadamente, o secuencialmente una cantidad efectiva de uno o más de otros ingredientes activos. En una modalidad, el otro ingrediente o ingredientes
10 activos son fármacos que disminuyen la glucosa oral actualmente disponibles a partir de una clase de fármacos que es considerada previo a la administración del estándar de cuidado como se determina por las directrices de la industria tales como la Asociación Americana de Diabetes.

15 Los compuestos de la presente invención utilizan un ácido graso químicamente conjugado al grupo épsilon-amino de una cadena lateral de lisina. El ácido graso es conjugado al grupo épsilon-amino de una cadena lateral de lisina a través de un enlazador. El enlazador comprende [2-(2-Amino-etoxi)-
20 etoxil]-acetil)₂-(γGlu)_a en donde a es 1 a 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. Los compuestos de la presente invención comprende una lisina en la posición 20 que
25 es químicamente modificada a través de la conjugación al grupo

épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ en donde a es 1 a 2 y b es 10 a 20. Como se muestra en las estructuras químicas de los Ejemplos 1 y 2, la primera unidad de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$ está ligada al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina. La segunda unidad de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$ es entonces unida al grupo amino de la primera unidad de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$. Entonces, la primera unidad de γGlu está unida al grupo amino de la segunda unidad de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$ a través del grupo γ -carboxilo de la cadena lateral. Cuando $a = 2$, la segunda unidad de γGlu está unida al grupo α -amino de la primera unidad de γGlu a través del grupo γ -carboxilo de la cadena lateral. Finalmente, el ácido graso simétrico está unido al grupo α -amino de la primera (cuando $a = 1$) o segunda (cuando $a = 2$) unidad de γGlu .

Los compuestos de la invención son preferiblemente formulados como composiciones farmacéuticas administradas por rutas parenterales (*por ejemplo*, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, o transdermal). Tales composiciones y procesos farmacéuticos para preparar los mismos son bien conocidos en la técnica. (Véase, *por ejemplo*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21ra. Edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). La ruta preferida de administración es subcutánea.

Los compuestos de la presente invención pueden reaccionar con cualquiera de un número de ácidos 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, 2da. Edición Revisada (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts," Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, No. 1, Enero 1977. Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen sales de trifluoroacetato, clorhidrato y acetato.

Como se usa en la presente, el término "cantidad efectiva" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de la presente invención, o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable el cual, después de la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Una cantidad efectiva puede ser fácilmente determinada por el especialista que atiende, como un experto en la técnica, por el uso de técnicas conocidas y observando resultados obtenidos bajo circunstancias análogas. En la determinación de la cantidad efectiva para un paciente, un número de factores son considerados por el especialista que atiende, que incluye, pero no se limita a: las especies de mamífero; su tamaño, edad, y

salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado o involucramiento o la severidad de la enfermedad o trastornos; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de
5 administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y las otras circunstancias relevantes.

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

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

Ciertos compuestos de la presente invención son en general efectivos sobre un amplio intervalo de dosificaciones. Por ejemplo, dosificaciones para dosificación una vez a la semana pueden caer dentro del intervalo de aproximadamente 0.05
20 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 una vez a la semana.

Las secuencias de aminoácido de la presente invención
25 contienen los códigos de una letra o tres letras estándares

para los veinte aminoácidos que se originan naturalmente. Adicionalmente, "Aib" es ácido alfa amino isobutírico y "1-Nal" es 1-Naftilalanina.

La presente invención también abarca nuevos intermediarios y procesos útiles para la síntesis de 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 que usa síntesis química es ilustrado en los Ejemplos siguientes. 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 del alcance de la invención en cualquier forma.

EJEMPLO 1

20 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID

Acoplamiento extendido (4h cada uno) por Pro31, Trp25, Gln24, Val23, Phe22, Lys20, Gly4, Glu3 y Aib2 son necesariamente para mejorar la calidad del péptido crudo. Se

usa un bloque de construcción Fmoc-Lys(Alloc)-OH para acoplamiento de Lys20 (grupo protector ortogonal) para permitir al sitio específico adjunto a la porción de ácido graso más tarde en el proceso sintético. Se usan las siguientes

5 condiciones para el acoplamiento de Fmoc-Ile-OH en posición 12: Fmoc-Ile-OH (6 equiv), PyBOP (6 equiv), y DIEA (12 equiv) en DMF por 24 h a 25°C. El residuo N-terminal es incorporado como Boc-Tyr(tBu)-OH usando protocolos DIC-HOBt como se describe anteriormente.

10 Después del terminado del alargamiento del péptido-resina descrito anteriormente, el grupo protector Alloc presente en Lys20 es removido usando cantidades catalíticas de Pd(PPh₃)₄ en la presencia de PhSiH₃ como un depurador. Los ciclos de acoplamiento/desprotección adicionales usando una

15 estrategia Fmoc/t-Bu para ampliar la cadena lateral Lys20 involucrada en Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH (ChemPep Catalog#280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (ChemPep Catalog#100703) y HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu. En todos los acoplamientos, se usan 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en

20 DMF por 4h a 25°C.

El desdoblamiento concomitante de la resina y remoción del grupo protector de cadena lateral se llevan a cabo en una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano:1,2-etanditiol:agua:tioanisol 90:4:2:2:2

25 (v/v) por 2 h a 25°C seguido por precipitación con éter frío.

El péptido crudo es purificado a > 99% de pureza (15-20% de
rendimiento purificado) por cromatografía HPLC de fase inversa
con agua/acetonitrilo (que contiene 0.05% v/v de TFA) gradiente
en una columna C18, donde las fracciones adecuadas se combinan
5 y liofilizan.

En una síntesis realizada esencialmente como se
describe anteriormente, la pureza del Ejemplo 1 se examinó por
HPLC de fase inversa analítica, y se confirmó la identidad
usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3 = 1605.2$; Calculado $M+3H^+/3$
10 $= 1605.5$; observado: $M+4H^+/4 = 1204.3$; Calculado $M+4H^+/4$
 $= 1204.4$).

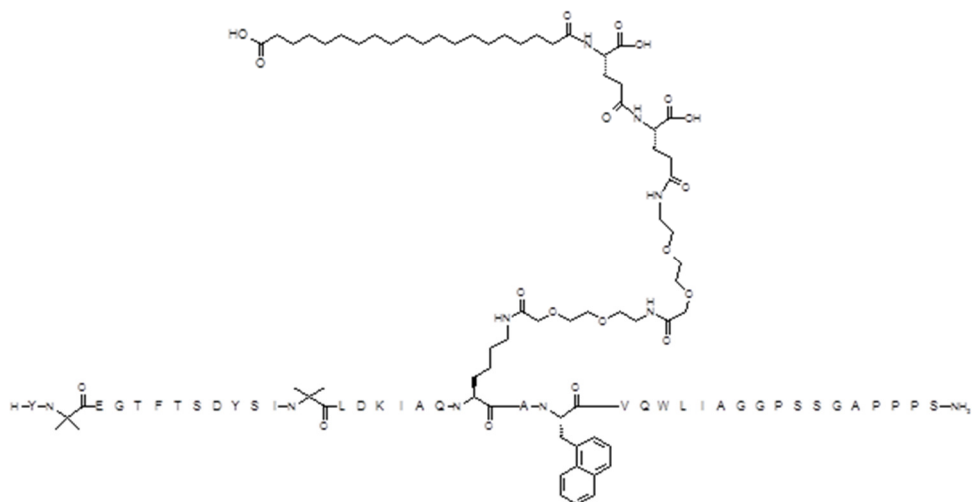
EJEMPLO 2

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es
15 químicamente modificado a través de conjugación al grupo
épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
etoxil-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el
aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-
terminal (SEQ ID NO: 4)

20 sal de trifluoroacetato

5



La estructura anterior contiene el código de
 10 aminoácido de una letra estándar con excepción de residuos
 Aib2, Aib13, K20 y 1-Nal22 donde las estructuras de estos
 residuos de aminoácido se han ampliado.

El péptido de conformidad con la SEQ ID NO: 4 de la
 presente invención es sintetizado de manera similar como se
 15 describe anteriormente en el Ejemplo 1. Las siguientes
 condiciones se usan para el acoplamiento de Fmoc-1Nal-OH en
 posición 22: Fmoc-1Nal-OH (6 equiv), PyBOP (6 equiv), y DIEA
 (12 equiv) en DMF por 4 h a 25°C.

EJEMPLO 3

20 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es
 químicamente modificado a través de conjugación al grupo
 épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
 etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; y el aminoácido C-
 25 terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID

NO: 5).

Sal de trifluoroacetato

El compuesto de conformidad con la SEQ ID NO: 5 de la presente invención es sintetizado de manera similar como se describe anteriormente por Ejemplo 1.

EJEMPLO 4

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6).

sal trifluoroacetato

El compuesto de conformidad con la SEQ ID NO: 6 de la presente invención es sintetizado de manera similar como se describe anteriormente por Ejemplo 1.

EJEMPLO 5

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7)

sal de trifluoroacetato

El compuesto de conformidad con la SEQ ID NO: 7 de la presente invención es sintetizado de manera similar como se describe anteriormente por Ejemplo 1.

5

EJEMPLO 6

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
10 etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 8).

sal de trifluoroacetato

El compuesto de conformidad con la SEQ ID NO: 8 de
15 la presente invención es sintetizado de manera similar como se describe anteriormente por Ejemplo 1.

EJEMPLO 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
20 etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 9)

25

sal de trifluoroacetato

El compuesto de conformidad con la SEQ ID NO: 9 de la presente invención es sintetizado de manera similar como se describe anteriormente por Ejemplo 1.

EJEMPLO 8

5 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el
10 aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 10).

sal de trifluoroacetato

El compuesto de conformidad con la SEQ ID NO: 10 de la presente invención es sintetizado de manera similar como se
15 describe anteriormente por Ejemplo 1.

ENSAYOS

Se proporcionan abajo las condiciones y datos para los Ejemplos en varios ensayos: función *in vitro* y perfiles de selectividad, inmunogenicidad, farmacocinéticas, y modelos de
20 diabetes tipo 2 *in vivo*.

Función y Selectividad *in vitro*

Potencia de unión *in vitro* a Receptores GLP-1 y GIP humanos

Se evalúa la potencia de unión *in vitro* de los compuestos de la presente invención a receptores GIP y GLP-1
25 humano midiendo las afinidades de unión, como K_i, usando

membranas celulares crudas obtenidas de las líneas de célula clonal que sobre-expresan ya sea el ADNc GLP1R humano o ADNc GIP-R humano.

El ensayo de unión del receptor de polipéptido
5 insulínico dependiente de glucosa humano utiliza hGIP-R
(Usdin,T.B., Gruber,C., Modi,W. y Bonner,T.I., GenBank:
AAA84418.1) clonado en plásmido pcADN3.1 (Promega)-NeoR. El
plásmido hGIP-R-pcADN3.1/Neo es transfectado en Células de
Ovario de Hámster Chino, CHO-S, para cultivos de suspensión y
10 seleccionado en la presencia de 500 µg/mL Geneticina
(Invitrogen).

Se prepararon membranas de plasma cruda usando
células del cultivo de suspensión. Las células se lisaron en
hielo en amortiguador hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM,
15 pH 7.5, MgCl₂ 1 mM, ADNse1, 20 µ/mL, y EDTA sin Inhibidores
Complete™ Roche. La suspensión celular es homogenizada con un
homogenizador de vidrio Dounce usando una mano de mortero
Teflon® por 25 golpes. Lo homogenado se centrifugó a 4°C a 1800
x g por 15 minutos. Lo sobrenadante se recolectó y la pelletilla
20 se resuspendió en amortiguador hipotónico y se homogenizó
nuevamente. La mezcla se centrifugó a 1800 x g por 15 minutos.
El segundo sobrenadante se combinó con el primer sobrenadante.
Los sobrenadantes combinados son centrifugados nuevamente a
1800 x g por 15 minutos para clarificar. El sobrenadante
25 clarificado se transfirió a tubos de alta velocidad y se

centrifugó a 25,000 x g por 30 minutos a 4°C. La pelletilla de membrana se resuspendió en amortiguador de homogenización y se almacenó como alícuotas congeladas a -80 °C en congelador hasta el uso.

5 El GIP es radioyodado por el procedimiento I-125-lactoperoxidasa (Markalonis, J.J., *Biochem. J.* 113:299 (1969)) y se purificó por HPLC de fase inversa (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences NEX-402). La actividad específica es 2200 Ci/mmol. Se realizó la determinación de K_D por competición
10 homóloga usando hGIP frío en lugar de unión por insaturación. El ensayo de unión al receptor se lleva a cabo usando un Ensayo de Proximidad por Escintilación (SPA) con perllillas de glutinina de germen de trigo (WGA) (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) previamente bloqueadas con BSA libre de
15 ácido graso al 1% (Gibco, 7.5% BSA). El amortiguador de unión contiene HEPES 25 mM, pH 7.4, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 1 mM, BSA libre de ácido graso al 0.1%, 0.003% de Tween20, y EDTA sin Inhibidores Complete™ Roche. hGIP y los compuestos de la presente invención se disolvieron en 100% de DMSO y se
20 almacenaron a -20°C. Los compuestos son serialmente diluidos en amortiguador de unión. Después, 10 µL del compuesto diluido o 100% de DMSO es transferido en placas de ensayo de fondo claro Corning® 3632 que contienen 40 µL del amortiguador de unión de ensayo o GIP frío (NSB a 0.1 µM final). Entonces, se
25 agregó la membrana de 90 µL (3 µg/pocillo), 50 µL [^{125}I] GIP

(Perkin Elmer Life and Analytical Sciences a 0.15 nM final en la reacción), y 50 µL de perillitas WGA (150 µg/pocillo), se selló, y se mezcló en un agitador de placas por 1 minuto. Las placas se leyeron con un contador de escintilación MicroBeta®
5 después de 12 horas de tiempo de ajuste a temperatura ambiente.

Los resultados se calcularon como un porcentaje de unión a I-125-GIP específico en la presencia del compuesto. La concentración de IC₅₀ absoluta es derivada por regresión no lineal del porcentaje de unión específica de I-125-GIP contra
10 la concentración del compuesto agregado. La concentración de IC₅₀ es convertida a K_i usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

El ensayo de unión del receptor GLP-1 utiliza receptor de péptido 1 similar a glucagona humano clonado (hGLP-1R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD,
15 *Biochem Biophys Res Commun.* 196(1): 141-6, 1993) aislado de las membranas 293HEK. El cADN hGLP-1R es subclonado en el plásmido de expresión pH_D (expresión activada con Trans de la proteína C humana recombinante completamente gama-carboxilada, un factor antitrombótico. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls,
20 J. and Yan, S.B. *Bio/Technology* 5: 1189-1192, 1987). Este ADN plásmido es transfectado en células 293HEK y seleccionado con 200 µg/mL de Hidromicina.

Se prepararon membranas de plasma cruda usando células del cultivo de suspensión. Las células se lisaron en
25 hielo en amortiguador hipotónico que contiene Tris HCl 25 mM,

pH 7.5, MgCl_2 1 mM, ADNsel, 20 μmL , y EDTA sin Inhibidores Complete™ Roche. La suspensión celular es homogenizada con un homogenizador de vidrio Dounce usando una mano de mortero Teflon® por 25 golpes. Lo homogenado se centrifugó a 4°C a 1800 x g por 15 minutos. Lo sobrenadante se recolectó y la pelletilla se resuspendió en amortiguador hipotónico y se homogenizó nuevamente. La mezcla se centrifugó a 1800 x g por 15 minutos. El segundo sobrenadante se combinó con el primer sobrenadante. Los sobrenadantes combinados se centrifugaron nuevamente a 1800 x g por 15 minutos para clarificar. El sobrenadante clarificado se transfirió a tubos de alta velocidad y se centrifugó a 25000 x g por 30 minutos a 4°C. La pelletilla de membrana se resuspendió en amortiguador de homogenización y se almacenó como alícuotas congeladas a -80 °C en congelador hasta el uso.

El péptido 1 similar a glucagona (GLP-1) es radioyodado por el procedimiento de I-125-lactoperoxidasa y se purificó por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (NEX308). La actividad específica es 2200 Ci/mmol. Se realizó la determinación de K_D por competición homóloga en lugar de unión por insaturación debido a alto contenido de propanol en el material I-125 GLP-1. El K_D es estimado que será 0.329 nM y se usa para calcular valores K_i para todos los compuestos probados.

El ensayo de unión al receptor se lleva a cabo usando un Ensayo de Proximidad por Escintilación (SPA) con perlillas

de glutinina de germen de trigo (WGA) previamente bloqueadas con BSA libre de ácido graso al 1% (Gibco). El amortiguador de unión contiene HEPES 25 mM, pH 7.4, CaCl_2 2.5 mM, MgCl_2 1 mM, BSA libre de ácido graso al 0.1%, 0.003% de Tween20, y EDTA sin Inhibidores Complete™ Roche. El péptido 1 similar a glucagona se disolvió en 100% de DMSO a 1 mg/mL y se almacenó congelado a -20°C en alícuotas de 30 μL . La alícuota del péptido 1 similar a glucagona se diluyó y se usó en ensayos de unión dentro de la primera hora. El análogo de péptido se disolvió en 100% de DMSO y serialmente se diluyó en 100% de DMSO. Después, 10 μL de compuestos diluidos de la presente invención o 100% de DMSO se transfirieron en placas de ensayo de fondo claro Corning® 3632 que contiene 40 μL de amortiguador de unión de ensayo o glucagona fría (NSB a 1 μM final). Entonces, 90 μL de membranas (0.5 μg /pocillo), 50 μL de I-125-Péptido 1 similar a glucagona (0.15 nM final en la reacción), y se agregó 50 μL de perlillas WGA (150 μg /pocillo), se selló, y se mezcló en un agitador de placas por 1 minuto. Las placas se leyeron con un contador de escintilación MicroBeta® Trilux PerkinElmer Life and Analytical Sciences después de 12 horas de tiempo de ajuste a temperatura ambiente.

Los resultados se calcularon como un porcentaje de unión I-125-Péptido 1 similar a glucagona específica en la presencia de los compuestos. La concentración IC_{50} absoluta del compuesto es derivada por regresión no lineal del porcentaje

de unión específica of I-125-Péptido 1 similar a glucagona contra la concentración del compuesto agregado. La concentración de IC₅₀ es convertida a Ki usando la ecuación de Cheng-Prusoff.

5 En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, ciertos compuestos de la presente invención exhiben una relación hGLP-1R/hGIPR de aproximadamente 0.5-4.0 (Tabla 1). La relación de unión molar es normalizada a la relación molar correspondiente de una
10 mezcla de GIP y GLP-1 nativo. Este factor de normalización es 4.53 en base a datos de unión por GIP (Ki=0.175 nM) y GLP-1 (Ki=0.793 nM). El valor de 1.48 demuestra la actividad co-agonista balanceada del Ejemplo 1.

Tabla 1: Afinidad de Unión del Receptor, Ki, nM (SEM,
15 **n)**

Compuesto	GIP-R Humano	GLP-1R Humano	Relación absoluta de hGLP-1R/hGIP-R	Relación molar de hGLP-1R/hGIP-R
Ejemplo 1	34.4 (5.0, n=8)	232 (40, n=8)	6.7	1.48
GIP, 1-42	0.175 (0.022, n=8)	>175 (n=14)	>1000	
20 GLP-1, 7-36-NH ₂	>100 (n=15)	0.793 (0.099, n=8)	<0.008	
Ejemplo 3	26.7 (2.3, n=17)	427 (33, n=17)	16	3.53
Ejemplo 6	44.2 (3.6, n=14)	365 (28, n=14)	8.3	1.83
Ejemplo 7	46.1 (5.9, n=11)	352 (39, n=11)	7.6	1.68
Ejemplo 8	67.5 (9.9, n=6)	307 (35, n=6)	4.5	0.99
Ejemplo 4	40.7 (5.1, n=7)	714 (76, n=7)	17.5	3.86
Ejemplo 2	63.9 (11.8, n=8)	344 (60, n=8)	5.4	1.19
25 Ejemplo 5	17.8 (3.0, n=5)	158 (32, n=5)	8.9	1.96

Las medias son expresadas como medias geométricas con el error estándar de la media (SEM) y el número de réplicas (n) indicado en paréntesis. Un calificador (>) indica los datos no alcanzan un 50% de inhibición y el K_i es calculado usando la concentración más alta probada en el ensayo.

Ensayos hGIP-R, hGLP-1R, y hGCGR funcionales.

La actividad funcional *in vitro* hacia receptores GIP, GLP-1, y glucagona humanos para compuestos de la presente invención se determinan en líneas de célula clonal HEK-293 que expresan estos receptores. Cada uno receptor que sobre expresa la línea de célula es tratado con compuestos de la presente invención en DMEM (Gibco Cat# 31053) suplementado con 1X GlutaMAX™ (Gibco Cat# 35050), 0.25% de FBS, 0.05% de fracción V BSA, IBMX 250 μ M y HEPES 20 mM en 40 μ l de volumen de ensayo. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, el incremento resultante en cAMP intracelular es cuantitativamente determinado usando el Kit de Ensayo HTRF Dynamic 2 CisBio cAMP (Bedford, MA). De manera breve, los niveles de cAMP dentro de la célula se detectan agregando el conjugado cAMP-d2 en amortiguador de lisis celular (20 μ l) seguido por el anticuerpo anti-cAMP-Eu3⁺-Criptato, también en amortiguador de lisis celular (20 μ l). El ensayo competitivo resultante es incubado por al menos 60 minutos a temperatura ambiente, entonces se detectó usando el instrumento Envision® PerkinElmer con excitación a 320 nm y emisión a 665 nm y 620

nm. Las unidades Envision (emisión a 665nm/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 cantidad de cAMP generada (nM) en cada pocillo es convertida a un porcentaje de la respuesta máxima observada con ya sea controles GIP(1-42)NH₂ humano, GLP-1(7-36)NH₂ humano, o glucagón humano. Un valor EC₅₀ relativo y porcentaje superior (E_{máx}) se deriva por análisis de regresión no lineal usando el porcentaje de respuesta máxima contra la concentración del compuesto de la presente invención, ajustada a una ecuación logística de cuatro parámetros.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, ciertos compuestos de la presente invención demuestran actividad contra receptores GIP y GLP-1 humanos, mientras también se demuestra selectividad sobre el receptor de glucagón. En la tabla 2, se muestra la potencia funcional contra los receptores para los controles hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂, y hGlucagón nativos, y ciertos compuestos de la presente invención.

20

25

Tabla 2. Potencial funcional (EC_{50}) contra receptores GIP, GLP-1, y glucagona humanos.

Compuesto	GIP-R Humano		GLP-1R Humano		GCGR Humano	
	EC_{50} , nM $\pm$ SEM (n)	E_{max} , %	EC_{50} , nM $\pm$ SEM (n)	E_{max} , %	EC_{50} , nM $\pm$ SEM, (n)	E_{max} , %
Ejemplo 1	11.0 $\pm$ 0.9 (17)	97.9 $\pm$ 3.0	71.2 $\pm$ 7.2 (17)	85.2 $\pm$ 4.4	>1000 (13)	ND
Ejemplo 3	3.15 $\pm$ 0.34 (14)	106 $\pm$ 3	33.9 $\pm$ 3.2 (14)	96.2 $\pm$ 6.2	>1000 (10)	ND
Ejemplo 6	4.40 $\pm$ 0.71 (13)	106 $\pm$ 3	28.4 $\pm$ 4.2 (13)	104 $\pm$ 4	>1000 (9)	ND
Ejemplo 7	8.07 $\pm$ 0.70 (17)	106 $\pm$ 3	35.5 $\pm$ 2.6 (17)	97.2 $\pm$ 3.4	>1000 (13)	ND
Ejemplo 8	21.1 $\pm$ 2.7 (14)	108 $\pm$ 4	57.9 $\pm$ 6.8 (13)	88.4 $\pm$ 2.3	>1000 (10)	ND
Ejemplo 4	3.76 $\pm$ 0.83 (6)	102 $\pm$ 3	66.9 $\pm$ 14.9 (6)	100 $\pm$ 5	>1000 (2)	ND
Ejemplo 2	17.5 $\pm$ 2.0 (13)	94.7 $\pm$ 2.0	75.7 $\pm$ 6.0 (13)	98.2 $\pm$ 5.5	>1000 (9)	ND
Ejemplo 5	8.76 $\pm$ 0.86 (10)	105 $\pm$ 2	70.9 $\pm$ 9.7 (10)	105 $\pm$ 4	>1000 (10)	ND
hGLP-1(7-36)NH ₂			0.176 $\pm$ 0.015 (17)	102 $\pm$ 2		
hGIP(1-42)NH ₂	0.135 $\pm$ 0.010 (17)	100 $\pm$ 1				
hGlucagona					0.0208 $\pm$ 0.0024 (13)	115 $\pm$ 2

Las medias para EC_{50} son expresadas como medias geométricas $\pm$ error estándar de la media (SEM) con el número de réplicas (n) indicado en paréntesis. Las medias para E_{max} son expresadas como la media aritmética $\pm$ error estándar. ND

significa que la actividad agonista no se detectó. Un calificador (>) indica que un EC_{50} no puede ser determinado. Todos los valores muestran que son de tres dígitos significantes.

5 **Activación funcional de células hGIP-R para generar cAMP intracelular en línea de células que secretan incretina**

La actividad funcional de hGIP-R para compuestos de la presente invención se demuestra por la capacidad de los compuestos para generar cAMP intracelular en células GLUTag, una línea de célula enteroendocrina de murino relativamente diferenciada inmortalizada estable que expresa el gen proglucagona y secreta los péptidos similares a glucagona en una manera regulada. Las células son mantenidas a 37°C, 5% de CO₂, 95% de humedad en medio DMEM suplementado con glucosa 5.5 mM, 10% de FBS y glutamina 2 mM. Previo al ensayo, las células son tripsinizadas, formadas en pelotillas y sembradas en placas de ensayo de cultivo de tejido de 96 pocillos a una densidad de 20,000 células/pocillo. Las células se dejaron unirse y se incubaron por 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. En el día del ensayo, el medio se decantó de las células y 50 µl de Amortiguador EBSS (0.1% de BSA, glucosa 2 mM y IBMX 0.25 mM) que contiene un intervalo de concentraciones del compuesto (0.001 - 3 µM) se agrega a las células. La placa se incubó a 37°C por una hora y se determinaron los niveles de cAMP usando el kit HTRF cAMP Dynamic 2 Cisbio (Bredford, MA). Se agregó 25 µl de criptato

anti-cAMP y 25 μ l de cAMP d2 a cada pocillo y las placas se incubaron por una hora a temperatura ambiente. Las placas se leyeron a 620 nm y 665 nm en un Tecan Genios Pro. Los resultados se calcularon de la relación 665nm/620 nm multiplicado por 10000, y convertido a cAMP nM por cavidad usando una curva estándar cAMP. Los datos se analizaron usando GraphPad usando un algoritmo logístico no lineal de 4 parámetros.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, ciertos compuestos de la presente invención muestran una acumulación cAMP intensificada, dependiente de la dosis de las células GLUTag (Tabla 3). El control de GLP-1 nativo falla al inducir cualquiera de los cambios en cAMP en todas las concentraciones probadas e indica que este sistema celular exclusivamente expresa el receptor GIP, por lo tanto, ciertos compuestos de la presente invención se puede mostrar por ejercer un efecto a través del receptor GIP.

Tabla 3: EC50 en células GLUTag.

Compuesto	EC50 promedio, nM (n)
Ejemplo 3	1610 (1)
Ejemplo 7	2746 (1)
Ejemplo 4	2186 (1)
Ejemplo 2	2918 (1)
Ejemplo 1	1494 (2)
Nativo GIP	11.62 (3)

**Medición de cAMP Intracelular en Células HEK293 Temporalmente
Que expresan el Receptor GLP-2 Humano**

La actividad funcional de hGLP-2R en la presencia de los compuestos de la presente invención es demostrada midiendo
5 cAMP Intracelular en Células HEK293. Estas células se hacen pasar en medio completo, transfectadas en suspensión con reactivo Eugene6 Promega y cADN GLP-2R de longitud completa humano en vector de expresión pcADN3.1, y se dejaron adherirse a hojuelas de cultivo de tejido en un ambiente humidificado a
10 37°C, 5% de CO₂. Después de aproximadamente 48 horas de propagación, las células se recogieron, se filtraron y criopreservaron con congelación de índice controlado y 10% de DMSO como un crioprotector. En ensayos subsecuentes, un vial listo para el ensayo único de la misma congelación celular es
15 descongelado para minimizar la variación inter-ensayo. En el día de ensayo del ensayo celular, el medio de congelación se intercambió con DMEM Invitrogen 31053 que contiene 0.5% de FBS.

Las células se cuantificaron para viabilidad y se equilibraron por aproximadamente una a dos horas a 37°C antes
20 del tratamiento. Los compuestos de la presente invención son solubilizados en DMSO e inmediatamente se diluyeron con medio DMEM que contiene 0.1% de BSA fracción V e inhibidor de fosfodiesterasa no específico, IBMX. La duración del tratamiento es 30 minutos a 37°C. La concentración de DMSO
25 final no excede 1.1%, y la concentración de IBMX final es

250 μ M. Se mide el cAMP cíclico usando el ensayo dynamic 2 con tecnología fluorescente resuelto con tiempo homogéneo (Cisbio Bioassays, Bedford, MA). Las concentraciones de cAMP respectivas se deducen del método de relación del cálculo y estándares externos. Las respuestas de la dosis sigmoideal de los compuestos probados son examinadas usando la ecuación logística de cuatro parámetros y se comparan al ligando C₁₈-acilado nativo.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, los controles de GLP-2 humano C₁₈-acilado tiene un valor EC₅₀ para la activación del receptor de 1.71 nM mientras ciertos compuestos de la presente invención tienen valores EC₅₀ de aproximadamente 100x a 1000x mayores. Los valores EC₅₀ para ciertos compuestos de la presente invención demuestran selectividad contra el receptor GLP-2.

Tabla 4: medición de la actividad funcional de GLP-2R en Células HEK293.

Compuesto	Rel EC50 (nM)	n
GLP2-C ₁₈ -diácido	1.857	4
Ejemplo 3	199.3	4
Ejemplo 7	1,800	4
Ejemplo 4	405	2
Ejemplo 1	238	4
Ejemplo 2	1612	2

Secreción de Insulina de isletas de Roedor

Para valorar la acción de los compuestos de la presente invención en un sistema que representa secreción de insulina en niveles de expresión de GLP-1R y GIP-R fisiológico,
5 los compuestos se prueban para efectos en secreción de insulina de isletas de roedor tipo silvestre.

Después de la canulación de conducto biliar común en ratones C57B1/6 (22-26 g) o ratas Sprague-Dawley machos (aprox. 250 g), el páncreas se distendió con amortiguador de Hank (3
10 ml por ratón o 10 ml para ratas, que contienen 2% de BSA y 0.75 mg/ml de collagenasa Clzyme (VitaCyte). Subsecuentemente, los tejidos se digieren en amortiguador de Hank a 37°C por 11-13 minutos (ratones) o 14-16 minutos para páncreas de rata. Se cultivaron isletas purificadas (gradiente Histopaque-1100
15 [Sigma-Aldrich], 18 min a gravedad 750x) durante la noche en medio RPMI-1640 (Invitrogen) que contiene 10% de FBS, 100 u/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina y preacondicionado por inanición en Solución Salina Balanceada de Earle (EBSS) suplementado con 0.1% de BSA y glucosa 2.8 mM.
20 Subsecuentemente, las isletas se incuban en EBSS (Invitrogen) suplementado con 0.1% de BSA, glucosa 2.8-11.2 mM y niveles incrementados del compuesto (6 lotes de 4 isletas/condición). Se usó la amida GLP-1 (7-36) (30 nM) como un control positivo. Se midió la insulina durante 90 minutos en sobrenadante usando
25 el Ensayo de Insulina MSD (Meso Scale, Gaithersburg, MD).

Ciertos compuestos de secreción de insulina incrementada dependiente de la dosis de la presente invención de isletas tanto de rata como de ratón como se describe en la Tabla 5.

5 **Tabla 5. Secreción de Insulina de Isleta de Roedor**

10	Secreción de insulina de isleta de rata		
	Compuesto	ED50 Media (nM)	N
	Ejemplo 3	34.9	2
	Ejemplo 1	15.5	3
	Secreción de Insulina de Isleta de ratón		
	Compuesto	ED50 Media (nM)	N
	Ejemplo 3	58.9	2
	Ejemplo 6	51.4	1
	Ejemplo 7	11.3	1
15	Ejemplo 4	3.5	1
	Ejemplo 2	30.0	1
	Ejemplo 1	47.2	2

Perfil de Inmunogenicidad

El riesgo de inmunogenicidad para compuestos de la presente invención se valoró usando programas de predicción *in silico*, tal como análisis *in silico* Epivax. El riesgo de inmunogenicidad para compuestos de la presente invención también se valoró por un método *ex-vivo* para medir las respuestas de células T cultivadas (absorción de ³H-timidina y secreción de citocina IL-2) en la presencia de compuestos de la presente invención.

25 Con herramientas inmune-informáticas Epivax, se

realizó una valoración *in silico* en compuestos de la presente invención para pronosticar una respuesta inmune después de la administración. El análisis utiliza la probabilidad de una estructura 9-mer para unirse a un alelo de antígeno de leucocito antígeno de leucocito humano dado (HLA) y después la detección de estos Epi-Bars. Por ejemplo 1, un registro EpiMatrix de aproximadamente +1.13 indica un potencial mucho menor para inducir una respuesta inmune comparada a un armazón de péptido GIP nativo con un registro EpiMatrix de +15.4. Un co-agonista GIP/GLP-1 del Ejemplo del documento WO 2011/119657 tiene un registro de +29.5.

También se examinó una medición de la inmunogenicidad clínica prevista para compuestos de la presente invención usando la caracterización de proliferación de célula T CD4+ y secreción de citocina IL-2 en un cohorte de 50 donadores saludables representativos de la población de halotipo HLA mundial. Ciertos compuestos de la presente invención demuestran un grado de estimulación de la célula T y secreción de IL-2 después de la exposición que no excede el umbral asociado con compuestos inmunogénicos conocidos o positivos, indicando un bajo riesgo de inmunogenicidad clínica producida.

Farmacocinéticas

Farmacocinéticas en Monos Cinomólogos.

Las propiedades de farmacocinética *in vivo* para compuestos de la presente invención se demuestran usando monos

cinomólgos. Los compuestos se administran por una dosis intravenosa o subcutánea única (0.2 mg/kg) en amortiguador de citrato 20 mM (pH 7.0) a un volumen de 0.21 ml/kg. La sangre se recolectó de cada animal a 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 204, 240 y 312 horas post-dosificación. Las concentraciones de plasma de los compuestos de la presente invención se determinan por un método LC/MS. De manera breve, un compuesto de la presente invención se extrae de muestra de plasma de Mono al 100% (50 µl) diluida con 1X PBS (150 µl) y se mezclan con N-butanol (400 µl). Se formaron tres capas de líquido distintas con el compuesto localizado en la capa superior. Un volumen de 200 µl se transfiere a una placa de 96 pocillos de fondo en V, se secó usando gas Nitrógeno calentado y se reconstituyó con 100 µl de 30% de acetonitrilo/0.1% de ácido fórmico. Se inyectó 20 µl de la muestra reconstituida en una columna de 3 µm C5 amplia Supelco AnalyticalDiscovery bio. El efluente de columna se dirige en un espectrómetro de masa Q-Exactive Thermo para detección y cuantificación.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo. El ejemplo 1 alcanzó una concentración de plasma máxima media de aproximadamente 8 horas después de la dosis subcutánea. La vida útil media es 55 horas y la separación media es 0.73 ml/hr/kg. La biodisponibilidad es aproximadamente 83%. Estos datos soportan el potencial de una dosificación semanal por el Ejemplo 1. Los datos de otros

compuestos de la presente invención se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6: Parámetros de Farmacocinética Media después de una Dosis Subcutánea Única de 0.2 mg/kg a Monos Cinomólogos Macho.

Compuesto	Media $T_{1/2}$ (hr)	T _{máx} Media (hr)	C _{máx} Media (μ g/mL)	AUC _{0-inf} media (hr* μ g/mL)	CL/F media (mL/hr/kg)
Ejemplo 3	34	8	3.0	153	1.3
Ejemplo 7	31	6	2.9	136	1.5
Ejemplo 6	23	4	2.2	72.3	2.8
Ejemplo 8	23	10	1.0	42.8	4.7
Ejemplo 2	43	24	2.1	173	1.2

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

Proyección de Potencia de la dosis

Se usó la prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa (ivGTT) en la rata para estimar la potencia relativa de compuestos de la presente invención en comparación a semaglutida. Se administraron dosis subcutáneas (SC) única de 0.1-10 nmol/kg de cada compuesto a las ratas y se administró una ivGTT a cada rata 16 horas después de la dosificación. La exposición se midió en el momento de la ivGTT, y para modelado de respuesta a la exposición, la AUC de insulina en respuesta a la ivGTT se usó como el punto final primario.

Se usó un modelo $E_{máx}$ para comparar los perfiles de respuesta a la exposición por el Ejemplo 1 para semaglutida.

En experimentos realizados esencialmente como se describe por este ensayo, la exposición es esencialmente la misma para el Ejemplo 1 y semaglutida para los niveles de dosis que tienen niveles de fármacos por arriba del límite de la cuantificación del ensayo. Ambas series de datos se fijan simultáneamente y los valores E_0 y $E_{máx}$ se ven limitados para ser el mismo para ambos compuestos. Solamente los valores ED_{50} se fijan separadamente para los compuestos. El valor ED_{50} para semaglutida es estimado como 0.6 ± 0.2 nmol/kg. La potencia del Ejemplo 1 es estimada como una potencia relativa para semaglutida y es 1.7 ± 0.6 veces la potencia de semaglutida. Ajustando para las diferencias CL/F (separación aparente) entre las dos moléculas en monos y también para la diferencia en peso molecular, la dosis equivalente humana media proyectada a 1 mg de semaglutida es aproximadamente 1.3 mg/semana para el Ejemplo 1.

Diabetes Tipo 2

Secreción de insulina in vivo en ratas después de la glucosa intravenosa (IVGTT)

Ratas Wistar macho (Harlan Labs, Indianápolis, IN) se aleatorizaron por peso corporal y se dosificaron con 1.5 ml/kg s.c, 16 horas antes de la administración de glucosa y entonces se sometieron a ayuno. Las dosis son el vehículo 0.1, 0.3, 1, 3 y 10 nmol/kg. Los animales se pesaron y entonces se anestesiaron con pentobarbital de sodio (solución Nembutal

Sódico: Ovation Pharmaceuticals) dosificado i.p. (65 mg/kg, 30 mg/ml). En el tiempo cero, las muestras se recolectaron en tubos EDTA después de lo cual se administró glucosa (0.5 mg/kg, 5 ml/kg). Las muestras se recolectaron a 2, 4, 6, 10, 20, y 30 minutos después de la glucosa. Se determinaron niveles de glucosa en plasma usando un analizador Hitachi (Roche) y se midió la insulina en plasma por el ensayo de insulina MSD (Meso Scale, Gaithersburg, MD).

Como se muestra en la Tabla 7, ciertos compuestos de secreción de insulina mejorada dependiente de la dosis de la presente invención después de la inyección i.v. de glucosa. El ED₅₀ para insulina y los máximos incrementos en secreción de insulina (medido como área bajo la curva de insulina) se proporciona en la Tabla 7.

Tabla 7. Mejoramiento de secreción de insulina en el ensayo IVGTT de rata.

Compuesto	ED ₅₀ (nmol/kg)	% de incremento máx de insulina AUC
Ejemplo 3	1.00	314 +/- 38%
Ejemplo 3	1.42	219 +/- 19%
Ejemplo 6	2.58	289 +/- 4%
Ejemplo 7	4.33	335 +/- 35%
Ejemplo 7	1.10	278 +/- 26%
Ejemplo 8	6.13	324 +/- 30%
semaglutida	0.70	231 +/- 13%
Ejemplo 2	1.62	233 +/- 19%
Ejemplo 1	0.87	298 +/- 17%
Ejemplo 5	1.02	349 +/- 39%

**Efecto en pérdida de peso, composición corporal y esteatosis
hepática en ratones obesos inducidos con dieta (DIO)**

Los efectos en pérdida de peso, composición corporal y esteatosis hepática en ratones DIO para los compuestos de la presente invención se evaluaron en ratones DIO C57/BL6. Estos animales, a pesar de no ser diabéticos, exhiben resistencia a la insulina, dislipidemia y esteatosis hepática, las cuales son todas características de síndrome metabólico, después de ser colocadas en una dieta alta en grasa (60% de Kcal de grasa) por 12 semanas.

En este estudio, se usaron ratones macho C57/B16 obesos inducidos con dieta (DIO) de 23-24 semanas de edad, cada uno pesando 41-49 g y que tienen una masa de grasa inicial que varía desde 10.5-17.5 g. Los animales son individualmente alojados en una instalación de temperatura controlada (24°C) con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (luces a las 22:00), y libre acceso a alimento y agua. Después de 2 semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento (n=5/grupo) en base al peso corporal de manera que cada grupo tiene similar peso corporal medio de partida.

El control de vehículo, los compuestos de la presente invención (con dosis que varía de 10 a 100 nmol/kg), o una semaglutida análogo de GLP1 de acción prolongada (30 nmol/kg), disueltos en el vehículo (Amortiguador de Citrato 20 nM a pH

7.0), se administraron por inyección SC a ratones DIO alimentados *ad libitum* 30-90 minutos antes del inicio del ciclo de oscuridad cada tres días por 15 días. Se realizaron inyecciones SC en el Día 1, 4, 7, 10 y 13. Se midieron el peso corporal e ingesta de alimento diariamente a través del estudio. Se calcularon los cambios absolutos en peso corporal sustrayendo el peso corporal del mismo animal antes de la primera inyección del compuesto. En los días 0 y 14, se midió la masa de grasa total por resonancia magnética nuclear (NMR) usando in instrumento Echo Medical System (Houston, TX).

En el día 15, se midió la glucosa en sangre con glucómetro Accu-Chek (Roche) de sangre de la vena de la cola y después los animales se sacrificaron y se removieron los hígados y se congelaron. Se midieron los triglicéridos en hígado, determinado de homogenados de hígados recolectados en el sacrificio, y el colesterol en plasma en un analizador clínico Hitachi Modular P. Se realizaron comparaciones estadísticas entre los grupos usando ANOVA de una vía seguido por la prueba de comparación múltiple de Dunnett. El ED₅₀ para pérdida de peso disminuida se determinó en GraphPad Prism usando la herramienta de ajuste no lineal.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, ciertos compuestos de la presente invención reducen el peso corporal y masa de grasa de una manera dependiente de la dosis (Tabla 8-13), y se comparó a

semaglutida, puede ser 3-5x más eficaz en la disminución del peso corporal. El ED₅₀ del Ejemplo 1 en porcentaje de pérdida de peso corporal es 5.442 nmol/kg (95% de los niveles de intervalo de confianza [nmol/kg] = 2.2 a 13.6). El peso corporal reducido se encontró ser principalmente debido a la reducción de masa en grasa.

Tabla 8. Porcentaje de peso corporal o cambio en masa de grasa en ratones DIO.

10

15

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	% de Cambio de peso corporal de partida	% de Cambio de la masa de grasa de partida
Control	0	-3.14 ± 0.88	-4.84 ± 1.79
Semaglutida	10	-12.36 ± 1.00****	-18.21 ± 2.24**
Semaglutida	30	-14.20 ± 1.01****	-21.90 ± 2.07***
Semaglutida	100	-19.30 ± 1.38****	-33.51 ± 3.30***
Ejemplo 3	10	-13.38 ± 0.88****	-20.76 ± 2.42***
Ejemplo 3	30	-18.13 ± 1.44****	-30.90 ± 2.06****
Ejemplo 3	100	-25.84 ± 1.93****	-45.92 ± 2.15****
Ejemplo 6	10	-15.31 ± 1.25****	-24.75 ± 1.89****
Ejemplo 6	30	-21.62 ± 0.92****	-36.30 ± 2.47****
Ejemplo 6	100	-33.95 ± 1.93****	-64.64 ± 4.04****

p<0.01, *p<0.001, ****p<0.0001 del grupo de control (ANOVA de una Vía, de Dunnett). Los resultados son expresados como Media ± SEM de 5 ratones por grupo.

25

Tabla 9. Porcentaje de peso corporal o cambio de masa de grasa en ratones DIO.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	% de Cambio del peso corporal de partida	% de Cambio de masa de grasa de partida
Control	0	-0.74 ± 1.49	3.04 ± 3.65
Semaglutida	30	-17.03 ± 0.98****	-35.94 ± 4.09****
Ejemplo 2	10	-23.27 ± 1.72****	-49.89 ± 5.62****
Ejemplo 2	30	33.07 ± 1.65****	-72.80 ± 4.04****
Ejemplo 2	100	-34.66 ± 1.80****	-76.20 ± 3.78****
Ejemplo 5	10	-23.42 ± 1.43****	-51.28 ± 1.89****
Ejemplo 5	30	-26.84 ± 3.14****	-62.77 ± 5.49****
Ejemplo 5	100	-37.86 ± 2.25****	-81.08 ± 1.68****
Ejemplo 1	10	-25.18 ± 1.82****	-50.98 ± 2.87****
Ejemplo 1	30	-26.58 ± 2.49****	-59.98 ± 6.60****
Ejemplo 1	100	-38.14 ± 1.67****	-79.79 ± 3.10****

****p<0.0001 del grupo control (ANOVA de una vía, de Dunnett). Los resultados son expresados como Media ± SEM de 5 ratones por grupo.

Tabla 10. Porcentaje de peso corporal o cambio de masa de grasa en ratones DIO.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	% de Cambio del peso corporal de partida	% de Cambio de la masa de grasa de partida
Control	0	-2.43 ± 2.06	-1.49 ± 3.69
Ejemplo 6	10	-17.54 ± 1.17****	-34.30 ± 1.20****
Ejemplo 6	30	-19.52 ± 1.18****	-39.52 ± 3.18****
Ejemplo 6	100	-29.36 ± 2.62****	-56.66 ± 4.96****
Ejemplo 7	10	-15.08 ± 1.22****	-26.46 ± 2.31****
Ejemplo 7	30	-20.70 ± 1.95****	-43.49 ± 5.47****
Ejemplo 7	100	-24.36 ± 2.06****	-49.92 ± 3.40****
Ejemplo 8	10	-17.13 ± 0.81****	-34.20 ± 1.62****
Ejemplo 8	30	-25.27 ± 0.70****	-54.24 ± 2.35****
Ejemplo 8	100	-29.91 ± 2.03****	-65.23 ± 6.69****

****p<0.001 del grupo control (ANOVA de una vía, de Dunnett). Los resultados son expresados como Media $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo.

Tabla 11. Glucosa en sangre, colesterol en plasma y triglicéridos en plasma en ratones DIO.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Glucosa en sangre (mg/dl)	Colesterol en Plasma (mg/dl)	Triglicéridos en Plasma (mg/dl)
Control	0	141.6 $\pm$ 5.59	303.2 $\pm$ 13.97	54.2 $\pm$ 11.14
Semaglutida	10	147.6 $\pm$ 6.13	226.8 $\pm$ 13.86**	27.36 $\pm$ 3.56*
Semaglutida	30	146.8 $\pm$ 8.43	229.8 $\pm$ 10.96**	27.9 $\pm$ 6.01*
Semaglutida	100	134.3 $\pm$ 9.22	218.4 $\pm$ 18.70**	36.46 $\pm$ 5.34
Ejemplo 3	10	109.5 $\pm$ 2.35***	213.2 $\pm$ 15.54***	30.38 $\pm$ 8.23
Ejemplo 3	30	107.6 $\pm$ 1.32***	177.4 $\pm$ 16.58****	21.32 $\pm$ 2.48**
Ejemplo 3	100	102.00 $\pm$ 0.50****	194.00 $\pm$ 14.40***	20.55 $\pm$ 4.60**
Ejemplo 6	10	105.8 $\pm$ 2.10***	198.4 $\pm$ 6.76****	20.78 $\pm$ 4.40**
Ejemplo 6	30	100.1 $\pm$ 3.29****	186.4 $\pm$ 17.04****	26.12 $\pm$ 6.85*
Ejemplo 6	100	103.6 $\pm$ 3.20****	151.4 $\pm$ 14.32****	17.26 $\pm$ 1.67***

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 del grupo de control (ANOVA de una vía, de Dunnett). Los resultados son expresados como Media $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo.

Tabla 12. Glucosa en sangre, colesterol en plasma y triglicéridos en hígado en ratones DIO.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Glucosa en Sangre (mg/dl)	Colesterol en Plasma (mg/dl)	Triglicéridos en Hígado (mg/g de tejido)
Control	0	144.30 ± 8.16	233.6 ± 12.99	206.65 ± 29.47
Semaglutida	30	136.3 ± 3.81	161.0 ± 13.92***	67.63 ± 23.40****
Ejemplo 2	10	110.8 ± 3.87**	121.8 ± 13.64****	60.77 ± 13.24****
Ejemplo 2	30	110.8 ± 3.20**	114.00 ± 9.70****	65.78 ± 17.07****
Ejemplo 2	100	113.2 ± 4.86**	109.4 ± 8.83****	56.74 ± 17.76****
Ejemplo 5	10	111.00 ± 6.56**	126.6 ± 9.67****	48.30 ± 8.14****
Ejemplo 5	30	104.5 ± 5.30***	108.2 ± 13.84****	39.60 ± 4.71****
Ejemplo 5	100	105.3 ± 6.16***	108.6 ± 4.83****	67.96 ± 13.53****
Ejemplo 1	10	102.3 ± 5.59****	120.6 ± 8.55****	60.74 ± 5.33****
Ejemplo 1	30	110.7 ± 5.85**	118.2 ± 10.11****	45.24 ± 5.87****
Ejemplo 1	100	106.7 ± 7.33***	107.6 ± 10.43****	66.98 ± 17.29****

*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 del grupo de control (ANOVA de una vía, de Dunnett). Los resultados son expresados como Media ± SEM de 5 ratones por grupo.

Tabla 13. Glucosa en sangre y colesterol en plasma en ratones DIO.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	Glucosa en Sangre (mg/dl)	Colesterol en Plasma (mg/dl)
Control	0	152.4 ± 3.63	243.6 ± 13.12
Ejemplo 6	10	121.4 ± 2.74***	167.8 ± 15.59****
Ejemplo 6	30	121.9 ± 6.65**	159.8 ± 9.99****
Ejemplo 6	100	116.1 ± 4.67****	144.2 ± 7.12****
Ejemplo 7	10	113.6 ± 4.16****	161.8 ± 6.2****
Ejemplo 7	30	114.7 ± 4.70****	153.6 ± 13.47****
Ejemplo 7	100	114 ± 2.36****	145.4 ± 9.48****
Ejemplo 8	10	114.7 ± 4.61****	158.8 ± 7.57****
Ejemplo 8	30	117.1 ± 8.26***	139.4 ± 6.83****
Ejemplo 8	100	125.4 ± 6.30**	127.8 ± 6.34****

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ del grupo control (ANOVA de una vía, de Dunnett). Los resultados son expresados como Media $\pm$ SEM de 5 ratones por grupo.

El efecto en metabolismo de energía en ratones DIO

5 Se evaluaron los efectos en metabolismo de energía en ratones DIO para compuestos de la presente invención en ratones macho DIO C57/B16 de 26 semanas de edad, pesando 43-50 g. Los ratones son individualmente alojados en instalaciones con temperatura controlada (24°C) con un ciclo luz/oscuridad
10 de 12 horas (luces en 22:00) y con libre acceso a alimento TD95217 (Teklad) y agua. Después de 2 semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se aleatorizaron a grupos de tratamiento ($n=6$ /grupo) en base al peso corporal de manera de cada grupo tiene similar peso corporal medio de partida. Los
15 animales se colocaron en un calorímetro PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Chesterfield, MO) por 3 días de aclimatación. El control de vehículo (amortiguador de citrato 20 mM a pH 7.0, 10 ml/kg), compuestos de la presente invención, o un análogo de GLP1 de acción prolongada, semaglutida, (30 nmol/kg) se
20 administran subcutáneamente a ratones DIO alimentados *ad libitum* por 30-90 minutos al inicio del ciclo de oscuridad cada tres días por 22 días. Se midieron el calor y cociente respiratorio (RER) por calorimetría indirecta como se describe usando un sistema de calorimetría de circuito abierto. La RER
25 es la relación de volumen de CO₂ producido (V_{CO_2}) al volumen de

O₂ consumido (Vo₂). Se calculó el calor con considerado en peso corporal total.

$$VO_2 = \text{FlujoML} * (V1 + V2) / N2\text{Ref} * \text{Peso animal} * 100)$$

$$VCO_2 = \text{FlujowML} * dCO_2 / \text{Peso animal} * 100)$$

$$5 \quad \text{Calor} = (CVO_2 * VO_2 + CVC O_2 * VCO_2) / 1000;$$

$$\text{donde } CVO_2 = 3.941; CVC O_2 = 1.106$$

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo, los ratones tratados con el Ejemplo 1 significativamente incrementan su índice metabólico 10 a 15% en comparación al grupo de control, partiendo de la semana 2, y manteniendo el efecto a través del periodo de tratamiento. La semaglutida, sin embargo, no tiene efecto en el índice metabólico. El incremento en índice metabólico para el Ejemplo 1 parcialmente considera la pérdida de peso adicional observado con el tratamiento del Ejemplo 1 en comparación con el tratamiento con semaglutida.

El efecto en vaciado gástrico en ratones DIO

Los efectos en vaciado gástrico en ratones DIO para compuestos de la presente invención se evalúa en ratones (Harlan) macho obesos inducidos con dieta (DIO) de 23 semanas de edad. Se sometió a ayuno a los ratones por 16-17 horas. Durante el inicio de periodo de ayuno los ratones se dosificaron subcutáneamente con el control de vehículo (amortiguador de citrato 20 mM a pH 7.0); dosis escalada de los compuestos de la presente invención (3, 10, 30 y 100

nmol/kg), o análogo de GLP1 de acción prolongada, semaglutida, (30 nmol/kg). Al siguiente día, los ratones se administró a los ratones 0.5 ml (0.5 gramos) de dieta semi-líquida recientemente preparada (2 minutos después) por sonda oral. Se
5 removi6 el agua en este momento para prevenir la diluci6n de la dieta administrada. Dos horas de la administraci6n de la dieta, los ratones se sacrificaron dos minutos despu6s con gas CO₂. El est6mago se removi6 mientras se sujeta en las aberturas tanto cardiaca como pil6rica, entonces las pizas se remueven y
10 en est6mago se pesa totalmente en un bote previamente pesado. Entonces se cort6 el est6mago y los contenidos se removieron. El est6mago se lav6 y se sec6, y se pes6 nuevamente para valorar los contenidos de alimento en el est6mago. El % de vaciado g6strico iguala $100 \times (1 - (\text{resto de alimento en el}$
15 $\text{est6mago/alimento administrado oralmente}))$.

En experimentos realizados esencialmente como se describe en este ensayo. El ejemplo 1 mostr6 el 6ndice de vaciado g6strico de la dieta semi-líquida en una manera dependiente de la dosis. La inhibici6n m6xima del vaciado
20 g6strico se observ6 a una dosis de 10 nmol/kg +/- dosis (Tabla 14).

Tabla 14. Vaciado gástrico de una dieta semi-líquida en ratones DIO C57/BL6 flacos.

<i>Tratamiento</i>	<i>Dosis (nmol/kg)</i>	<i>Porcentaje de Vaciado Gástrico (Media $\pm$ SEM)</i>
Vehículo (n=5)	0	69.50 $\pm$ 6.60
Semaglutida (n=5)	30	30.56 $\pm$ 7.53**
Ejemplo 1 (n=4)	3	49.11 $\pm$ 8.52
Ejemplo 1 (n=5)	10	9.76 $\pm$ 7.69****
Ejemplo 1 (n=5)	30	26.53 $\pm$ 8.14**
Ejemplo 1 (n=5)	100	18.45 $\pm$ 6.87***

Se realizaron comparaciones estadísticas entre los grupos usando ANOVA de una vía, seguido por prueba de comparación múltiple de Dunnett. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001 del grupo control. Los resultados son expresados como media $\pm$ SEM de 4-5 ratones por grupo.

Mediciones de Corticosterona en Plasma en Ratas Sprague

Dawley

Como se sugiere en ciertos estudios publicados, los niveles de corticosterona en plasma elevados con un indicador de posible tolerabilidad reducida para análogos GIP y GLP-1. Los niveles de corticosterona en plasma se evaluaron usando Ratas Sprague Dawley (Harlan, Indianápolis), pesando aproximadamente 220 g y se aclimataron por al menos 72 horas antes de la manipulación. Las ratas son entonces dosificadas con el vehículo (amortiguador de citrato 20 mM, pH 7), semaglutida (10 nmol/kg), o los compuestos de la presente invención a 3, 10 o 30 nmol/kg s.c., con 8 ratas por grupos de

dosis. Las ratas se decapitaron 16 horas más tarde. Se recolectó la sangre en tubos EDTA en hielo, entonces se centrifugaron por 5 minutos a 8000 RPM en una centrifugadora tabletop Eppendorf 5402. El plasma se almacenó a -80°C hasta el análisis.

Para análisis de corticosterona, se prepararon estándares de corticosterona (Sigma, 27840) por diluciones seriales en metanol grado HPLC, H₂O y la adición de 5% de suero de rata sin carbón mineral (Bioreclamation, RATSRL-STRPD-HEV). Las muestras de plasma de rata se diluyeron con PBS, se precipitaron con metanol frío, se incubaron por 20 minutos a -20°C, y entonces se centrifugaron bajo una corriente de gas N₂ y se reconstituyó en solución MeOH/H₂O (1:1). Las muestras se analizaron en el LC/MS equipado con una columna HPLC C18 3.5 µm XSelect CSH (2.1 mm x 30 mm) (Waters #186005254).

En experimentos realizados esencialmente como se describe para este ensayo, el Ejemplo 1 no demostró incremento en niveles de corticosterona en plasma en cualquiera de las dosis probadas mientras semaglutida tiene un incremento aproximadamente 4x sobre el control.

Tabla 15. Análisis de corticosterona en plasma en Ratas Sprague Dawley

Compuesto	Corticosterona (ng/ml)	
	Media	SEM
Vehículo	60.78	8.41
10 nmol/kg Semaglutida	274.57	42.06
3 nmol/kg Ejemplo 1	52.21	19.39
10 nmol/kg Ejemplo 1	32.46	9.78
30 nmol/kg Ejemplo 1	31.35	5.86

Secuencias de Aminoácido

10 SEQ ID NO: 1 (GIP Humano)
 YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO: 2 (GLP-1 Humano)
 HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

15 SEQ ID NO: 3
 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; y el aminoácido C-
 20 terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 4
 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo
 25 épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-

etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 5

5 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 6

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

20 en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

25 SEQ ID NO: 8

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
5 etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 9

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

10 en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-
15 terminal.

SEQ ID NO: 10

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X₁ es Aib; X₂ es Aib; K en posición 20 es químicamente modificado a través de conjugación al grupo
20 épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-
etoxil]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es aminado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 11

25 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

en donde X_1 es Aib; X_2 es Aib; K en posición 20 es químicamente
modificado a través de conjugación al grupo épsilon-amino de
la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-
(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en donde a es 1 hasta 2 y b es 10 hasta
5 20; X_3 es Phe o 1-Nal; y el aminoácido C-terminal es
opcionalmente aminado como una amida primaria C-terminal,

10

15

20

25

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

- 5 1. Un compuesto de la Fórmula:

$$\text{YX}_1\text{EGTFTSDYSIX}_2\text{LDKIAQKAX}_3\text{VQWLIAGGPSSGAPPPS};$$
 caracterizado porque

$$\text{X}_1 \text{ es Aib};$$

$$\text{X}_2 \text{ es Aib};$$
- 10 K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ en donde a es 1 a 2 y b es 10 a 20;

$$\text{X}_3 \text{ es Phe o 1-Nal};$$
- 15 y el aminoácido C-terminal es opcionalmente amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 11),
 o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.
- 20 2. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque X_3 es Phe.
3. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque X_3 es 1-Nal.
4. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-3, caracterizado porque b es 14 a 18.
5. El compuesto de conformidad con la
- 25 Reivindicación 4, caracterizado porque b es 16 a 18.

6. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 5, caracterizado porque b es 18.

7. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, caracterizado porque a es 1.

5 8. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, caracterizado porque a es 2.

9. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal.

10 10. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque

X_1 es Aib

X_2 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-(CH₂)₁₈-CO₂H;

X_3 es Phe;

y el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 3),

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

11. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque

X_1 es Aib

25 X_2 es Aib;

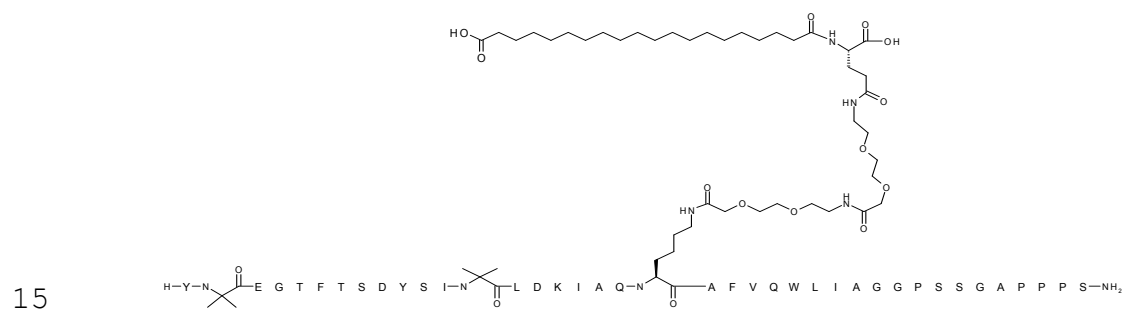
K en la posición 20 es químicamente modificado a través de la conjugación al grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H;

5 X₃ es 1-Nal;

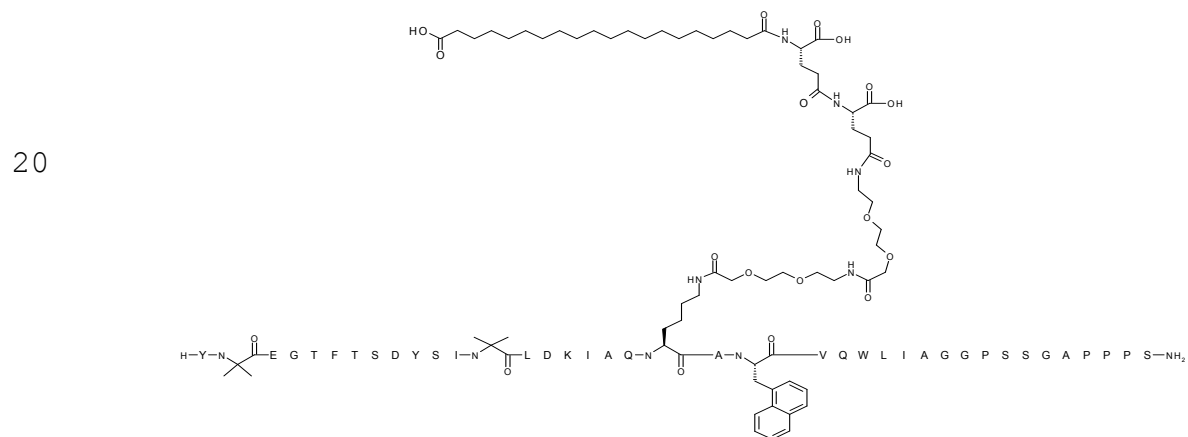
y el aminoácido C-terminal es amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 4),

o una sal del mismo farmacéuticamente aceptable.

12. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque la Fórmula ES:



13. El compuesto de conformidad con la Reivindicación 1, caracterizado porque la Fórmula es:



25 14. Una composición farmacéutica, caracterizada

porque comprende el compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 15. Un método para tratar diabetes mellitus tipo 2, caracterizado porque comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo, una cantidad efectiva del compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-13.

10 16. El método de conformidad con la reivindicación 13, caracterizado porque comprende además, administrar simultáneamente, separadamente o secuencialmente en combinación, una cantidad efectiva de uno o más agentes seleccionados a partir de metformina, tiazolidindionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil peptidasa 4, y co-transportadores de glucosa en sodio.

15 17. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, para uso en terapia.

18. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-13, para uso en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2.

20 19. El compuesto de conformidad con cualquiera de las Reivindicaciones 1-13 en combinación simultánea, separada o secuencial, con uno o más agentes seleccionados a partir de metformina, tiazolidindionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil peptidasa 4, y co-transportadores de glucosa en
25 sodio.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a compuestos
miméticos del péptido de incretina dual que agoniza los
receptores para tanto el polipéptido insulínico
5 dependiente de la glucosa humana (GIP) y péptido-1 similar al
glucagón (GLP-1), y pueden ser útiles para tratar diabetes
mellitus tipo 2 (T2D).

10

15

20

25

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2016/012124

International filing date (day/month/year)
05.01.2016

Priority date (day/month/year)
09.01.2015

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. C07K14/575 C07K14/605 A61K38/26

Applicant
ELI LILLY AND COMPANY

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step and industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Chavanne, Franz

Telephone No. +49 89 2399-0



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2016/012124

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))
3. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2016/012124

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-19</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 The claimed compound has been neither described nor suggested in the prior art. The subject-matter of claims 1-19 seems, thus, novel and inventive (Article 33(2)(3) PCT).

Re Item VIII

Certain observations on the international application

- 1 For the assessment of the present claims 15 and 16 on the question whether they are patentable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as patentable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment.
- 2 Claim 16 refers to a method. Claim 16 has been formulated as a dependent claim of claim 13. However, claim 13 is a product claim. It seems that claim 16 shall be formulated as a dependent claim of claim 15 (Article 6 PCT).
- 3 Claim 19 refers to the claimed compound of claims 1-13. Claim 19 further mentions that this compound is in simultaneous, separate or sequential combination with one or more agents. However, this does not correspond to technical features defining the compound itself but rather to indications concerning the therapeutical used thereof. It seems that claim 19 shall be formulated as dependent claim from independent claims 17 and 18 (Article 6 PCT).

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veuillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference X20448	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2016/012124	International filing date (<i>day/month/year</i>) 5 January 2016 (05-01-2016)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 9 January 2015 (09-01-2015)
Applicant ELI LILLY AND COMPANY		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**

a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:

☒

the international application in the language in which it was filed

☐

a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6**bis**(a)).

c. ☒

With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (see Box No III)

4. With regard to the **title**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the **abstract**,

☒

the text is approved as submitted by the applicant

☐

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,

a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. _____

☐

as suggested by the applicant

☐

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure

☐

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒

none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/012124

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13~~ter~~.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13~~ter~~.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13~~ter~~.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/012124

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K14/575 C07K14/605 A61K38/26
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2013/164483 A1 (ZEALAND PHARMA AS [DK]) 7 November 2013 (2013-11-07) abstract paragraphs [0005] - [0020], [0078] sequences 4, 30	1-19
A	WO 2012/088379 A2 (MARCADIA BIOTECH INC [US]; VIGNATI LOUIS [US]; DIMARCHI RICHARD D [US]) 28 June 2012 (2012-06-28) abstract paragraphs [0008] - [0013] sequence 115 ----- -/-	1-19



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 April 2016

Date of mailing of the international search report

25/04/2016

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Chavanne, Franz

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2016/012124

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GREEN B D ET AL: "STRUCTURALLY MODIFIED ANALOGUES OF GLUCAGON-LIKE PEPTIDE-1 (GLP-1) AND GLUCOSE-DEPENDENT INSULINOTROPIC POLYPEPTIDE (GIP) AS FUTURE ANTIDIABETIC AGENTS", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, NL, vol. 10, no. 29, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 3651-3662, XP009068381, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/1381612043382774 the whole document -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2016/012124

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013164483	A1	07-11-2013	AR 090937 A1 17-12-2014
			AU 2013255751 A1 18-12-2014
			CA 2872314 A1 07-11-2013
			CN 104470948 A 25-03-2015
			EA 201491918 A1 30-07-2015
			EP 2844669 A1 11-03-2015
			HK 1208232 A1 26-02-2016
			JP 2015517459 A 22-06-2015
			KR 20150003910 A 09-01-2015
			PH 12014502452 A1 02-02-2015
			SG 11201407137P A 27-11-2014
			TW 201348252 A 01-12-2013
			US 2015299281 A1 22-10-2015
			WO 2013164483 A1 07-11-2013

WO 2012088379	A2	28-06-2012	AR 084558 A1 22-05-2013
			AU 2011348202 A1 04-07-2013
			CA 2822617 A1 28-06-2012
			CN 103402536 A 20-11-2013
			EP 2654774 A2 30-10-2013
			JP 2014501762 A 23-01-2014
			KR 20140020851 A 19-02-2014
			NZ 611878 A 27-02-2015
			RU 2013133803 A 27-01-2015
			SG 191252 A1 31-07-2013
			US 2014018291 A1 16-01-2014
			WO 2012088379 A2 28-06-2012
