

ANÁLOGOS DE INCRETINA Y SUS USOS

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES DE PATENTES RELACIONADAS

La presente solicitud de patente reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense N.º 62/608.644 (presentada el 21 de diciembre de 2017), que se incorpora en la presente por referencia como si estuviera establecida en su totalidad.

CAMPO TÉCNICO

Esta divulgación se refiere a análogos de incretina que tienen actividad en cada uno de un polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP), péptido-1 tipo glucagón (GLP-1) y receptores de glucagón. Los análogos de incretina descritos en la presente pueden tener características estructurales que proporcionan una actividad equilibrada y tienen una duración de acción extendida en cada uno de estos receptores. Dichos análogos de incretina pueden ser útiles para tratar trastornos como la diabetes mellitus tipo 2 (T2DM), la dislipidemia, el síndrome metabólico, hepatopatía grasa no alcohólica (NAFLD), la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y/o la obesidad.

ANTECEDENTES

En las últimas décadas, la prevalencia de la diabetes ha seguido aumentando. La T2DM es la forma más común de diabetes que representa aproximadamente el 90 % de toda la diabetes. La T2DM se caracteriza por altos niveles de glucosa en la sangre causados por la resistencia a la insulina. El estándar actual de atención para la T2DM incluye la dieta y el ejercicio, así como el tratamiento con medicamentos orales y medicamentos inyectables para reducir la glucosa, incluidos las terapias basadas en incretina, como los agonistas del receptor de GLP-1.

GLP-1 es un péptido de 36 aminoácidos, cuyo principal fragmento biológicamente activo se produce como un péptido amidado del terminal C de 30 aminoácidos (GLP-1₇₋₃₆; SEQ ID NO: 2) que estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa y que previene la hiperglucemia en diabéticos. Actualmente existe una variedad de análogos de GLP-1 disponible para tratar la T2DM, incluidos dulaglutida, exenatida y liraglutida. Sin embargo, muchos agonistas del receptor de GLP-1 que se comercializan en la actualidad son de dosis limitada debido a efectos secundarios gastrointestinales, como náuseas y vómitos. Cuando el tratamiento con medicamentos orales y las terapias basadas en incretina son insuficientes, se considera el tratamiento con insulina. A pesar de las opciones de tratamiento disponibles, un

número significativo de personas que reciben terapias aprobadas no están alcanzando los objetivos de control glucémico (véase, por ejemplo, Casagrande *et al.* (2013) *Diabetes Care* 36: 2271-2279).

La diabetes no controlada puede llevar a una o más afecciones que tienen un impacto en la morbilidad y la mortalidad de dichos individuos. Uno de los principales factores de riesgo de la T2DM es la obesidad, y la mayoría de las personas con T2DM (~90 %) tienen sobrepeso u obesidad. Se ha documentado que una disminución en la adiposidad corporal causará una mejora en las comorbilidades asociadas a la obesidad, entre las que se incluyen la hiperglucemia y los eventos cardiovasculares. Por lo tanto, se necesitan terapias efectivas en el control de la glucosa y la reducción de peso para un mejor manejo de la enfermedad.

En vista de esto, las nuevas terapias bajo estudio incluyen compuestos que tienen no solo actividad en un receptor de GLP-1 sino también actividad en uno o más de otros receptores, tales como los receptores de GIP y/o glucagón. De hecho, se ha descrito que ciertos compuestos tienen actividad agonista triple (es decir, actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP). Por ejemplo, la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 2015/067716 describe análogos de glucagón que tienen actividad agonista triple. Del mismo modo, la solicitud de patente internacional N.º WO 2016/198624 describe análogos de exendina-4, un análogo de GLP-1 en sí mismo, que tiene actividad agonista triple. Del mismo modo, las solicitudes de patente internacional números WO 2014/049610 y WO 2017/116204 describen una variedad de análogos que tienen actividad agonista triple. Por otra parte, la solicitud de patente internacional N.º WO 2017/153375 describe los coagonistas de glucagón y GLP-1 que también se dice que tienen actividad GIP.

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de tratamientos, especialmente para la T2DM, que sean capaces de proporcionar un control efectivo de la glucosa, que tengan beneficios para la pérdida de peso y un perfil favorable de efectos secundarios. También existe la necesidad de agentes terapéuticos disponibles para su uso con una duración de acción lo suficientemente extendida para permitir una dosificación tan poco frecuente como una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana.

BREVE SÍNTESIS

Los análogos de incretina descritos en la presente buscan satisfacer las necesidades anteriores. Por consiguiente, esta divulgación describe análogos de incretina con actividad en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón.

Ventajosamente, los análogos de incretina descritos en la presente tienen una actividad equilibrada que permite la administración de dosis que proporcionan una actividad suficiente en cada receptor para brindar los beneficios del agonismo de ese receptor mientras se evitan los efectos secundarios no deseados asociados con demasiada actividad. Además, los análogos de incretina descritos en la presente tienen una duración de acción extendida en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón, lo que permite una dosificación tan poco frecuente como una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana. De esta manera, los análogos de incretina dan como resultado un mejor control de la glucosa, beneficios metabólicos como la reducción del peso corporal y/o una mejor composición corporal, beneficios lipídicos como la proproteína convertasa subtilisina/kexina tipo 9 (PCSK9), y/u otros beneficios tales como un aumento en la masa ósea o en la formación ósea o una disminución en la reabsorción ósea. Esta divulgación también describe tratamientos efectivos para otros trastornos o afecciones, que incluyen obesidad, NAFLD, NASH, dislipidemia y/o trastorno metabólico.

En una forma de realización, se proporciona un análogo de incretina que incluye la fórmula:

$\text{YX}_2\text{X}_3\text{GTX}_6\text{TSDYSIX}_{13}\text{LDKX}_{17}\text{AQX}_{20}\text{AFIEYLLEGGPSSGAPPPS}$, donde X_2 es Aib, X_3 es Q o H, X_6 es αMeF o $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$, X_{13} es L o αMeL , X_{17} es cualquier aminoácido con un grupo funcional disponible para la conjugación, donde el grupo funcional está conjugado con un ácido graso $\text{C}_{16}\text{-C}_{22}$, X_{20} es Aib, Q o H (SEQ ID NO: 5), y el aminoácido del terminal C está opcionalmente amidado, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En otra forma de realización, se proporciona un método para tratar una enfermedad tal como la dislipidemia, la hepatopatía grasa, el síndrome metabólico, la NASH, la obesidad y la T2DM. Dichos métodos pueden incluir al menos una etapa de administrar a un individuo que lo necesite una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente. En algunos casos, la enfermedad es hepatopatía grasa, obesidad, NASH o T2DM.

En otra forma de realización, un análogo de incretina como se describe en la presente se proporciona para su uso en terapia. Por ejemplo, se proporciona un análogo de incretina como se describe en la presente para su uso en el tratamiento de una enfermedad como la dislipidemia, la hepatopatía grasa, el síndrome metabólico, la NASH, la obesidad y la T2DM. En algunos casos, la enfermedad es hepatopatía grasa, obesidad, NASH o T2DM.

En otra forma de realización, se proporciona un análogo de incretina como se describe en la presente para su uso en la fabricación de un medicamento para tratar la dislipidemia, la hepatopatía grasa, el síndrome metabólico, la NASH, la obesidad y la T2DM. En algunos casos, la enfermedad es hepatopatía grasa, obesidad, NASH o T2DM.

En otra forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica que incluye un análogo de incretina como se describe en la presente y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, diluyente o excipiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

A menos que se definan lo contrario, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente tienen el mismo significado que les otorga habitualmente una persona del oficio de nivel medio del ámbito al que pertenece la divulgación. Si bien los métodos y los materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente se pueden usar en la práctica o en los ensayos de los análogos de incretina, las composiciones farmacéuticas y los métodos, en la presente se describen los métodos y los materiales preferidos.

Además, la referencia a un elemento por el artículo indefinido "un" o "una" no excluye la posibilidad de que haya más de un elemento presente, a menos que el contexto requiera claramente que haya uno y solo un elemento. El artículo indefinido "un" o "una" por lo general significa "al menos uno".

GIP es un péptido de 42 aminoácidos (SEQ ID NO: 4) y es una incretina, que desempeña un papel fisiológico en la homeostasis de la glucosa al estimular la secreción de insulina de las células beta pancreáticas en presencia de glucosa.

GLP-1 es un péptido de 36 aminoácidos (SEQ ID NO: 2) y también es una incretina, que estimula la secreción de insulina dependiente de glucosa y que se ha demostrado que previene la hiperglucemia en diabéticos.

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos (SEQ ID NO: 1) que ayuda a mantener la glucosa en la sangre al unirse y activar los receptores de glucagón en los hepatocitos, lo que hace que el hígado libere glucosa, almacenada en forma de glucógeno, a través de un proceso llamado glucogenólisis.

La oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye no solo la secuencia de 29 aminoácidos del glucagón, sino también una extensión del terminal carboxi del octapéptido (SEQ ID NO: 3) que activa los receptores de glucagón y GLP-1, con una potencia ligeramente mayor para el receptor de glucagón que para el receptor de GLP-1.

Además de la T2DM, se ha descrito que las incretinas y sus análogos que tienen actividad en uno o más de los receptores GIP, GLP-1 y/o glucagón tienen un potencial de valor terapéutico en una serie de otras afecciones, enfermedades o trastornos, entre ellos: por ejemplo, la obesidad, NAFLD y NASH, la dislipidemia, el síndrome metabólico, los trastornos relacionados con los huesos, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Véase, por ejemplo, Jall *et al.* (2017) *Mol. Metab.* 6: 440-446; Carbone *et al.* (2016) *J. Gastroenterol. Hepatol.* 31: 23-31; Finan *et al.* (2016) *Trends Mol. Med.* 22: 359-376; Choi *et al.* (2017) *Potent body weight loss and efficacy in a NASH animal model by a novel long-acting GLP-1/Glucagon/GIP triple-agonist (HM15211)*, ADA Poster 1139-P; Ding (2008) *J. Bone Miner. Res.* 23: 536-543; Tai *et al.* (2018) *Brain Res.* 1678: 64-74; Müller *et al.* (2017) *Physiol. Rev.* 97: 721-766; Finan *et al.* (2013) *Sci. Transl. Med.* 5: 209; Hölscher (2014) *Biochem. Soc. Trans.* 42: 593-600.

Definiciones

Como se usa en la presente, "aproximadamente" significa dentro de un rango significativo en términos estadísticos de un valor o valores tales como, por ejemplo, una concentración, una longitud, un peso molecular, un pH, una identidad de secuencia, un marco de tiempo, una temperatura o un volumen determinados. Este valor o rango puede estar en un orden de magnitud, típicamente, dentro del 20 %, más típicamente, dentro del 10 %, y aún más típicamente, dentro del 5% de un valor o rango dado. La variación admisible comprendida por "aproximadamente" dependerá del sistema particular que se estudie y puede ser determinada con facilidad por una persona del oficio de nivel medio.

Como se usa en la presente, y en referencia a uno o más de los receptores GIP, GLP-1 o glucagón, "actividad", "activar", "activación" y similares significa una capacidad de un compuesto, como los análogos de incretina descritos en la presente, para unirse e inducir una respuesta en el o los receptores, según se mide usando los ensayos conocidos en la técnica, como los ensayos *in vitro* que se describen a continuación.

Como se usa en la presente, "aminoácido con un grupo funcional disponible para la conjugación" significa cualquier aminoácido natural o no natural con un grupo funcional que se puede conjugar con ácido graso mediante, por ejemplo, un ligador. Los ejemplos de estos grupos funcionales incluyen, entre otros, alquínilo, alquenilo, amino, azido, bromo, carboxilo, cloro, yodo, y grupos tiol. Los ejemplos de aminoácidos naturales que incluyen dichos grupos funcionales incluyen K (amino), C (tiol), E (carboxilo) y D (carboxilo).

Como se usa en la presente, "ácido graso C₁₆-C₂₂" significa un ácido carboxílico

que tiene entre 16 y 22 átomos de carbono. El ácido graso C₁₆-C₂₂ adecuado para su uso en la presente puede ser un monoácido saturado o un diácido saturado. Como se usa en la presente, "saturado" significa que el ácido graso no contiene enlaces dobles o triples carbono-carbono.

Como se usa en la presente, "cantidad eficaz" significa una cantidad, concentración o dosis de uno o más análogos de incretina descritos en la presente, o una de sus sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico que, después de la administración de una dosis única o múltiple a un individuo que lo necesite, proporciona un efecto deseado en dicho individuo que está bajo diagnóstico o tratamiento. Una persona del oficio de nivel medio puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un individuo, se consideran una serie de factores que incluyen, entre otros, la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado o la participación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno; la respuesta del paciente individual; el análogo particular de incretina administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Como se usa en la presente, "duración de acción extendida" significa que la afinidad de fijación y la actividad de un análogo de incretina continúan por un período de tiempo mayor que el GIP, el GLP-1 y los péptidos de glucagón humanos nativos, permitiendo la dosificación al menos tan poco frecuente como una vez al día o incluso tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana. El perfil de acción en el tiempo del análogo de incretina se puede medir utilizando métodos de ensayo farmacocinéticos conocidos, como los que se utilizan en los ejemplos a continuación.

Como se usa en la presente, "análogo de incretina" significa un compuesto que tiene similitudes estructurales con, pero múltiples diferencias, entre cada GIP, GLP-1 y glucagón, especialmente GIP (SEQ ID NO: 4), GLP-1 (SEQ ID NO: 2) y glucagón (SEQ ID NO: 1) humanos. Los análogos de incretina descritos en la presente incluyen secuencias de aminoácidos que dan como resultado compuestos que tienen afinidad y actividad en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón (es decir, actividad agonista triple).

Como se usa en la presente, "individuo que lo necesite" significa un mamífero, como un ser humano, con una afección, una enfermedad, un trastorno o un síntoma que

requiere tratamiento o terapia, incluidos, por ejemplo, los enumerados en la presente.

Tal como se usa en la presente, "tratar", "tratamiento", "para tratar" y similares significa restringir, desacelerar, detener o revertir la progresión o gravedad de una condición, una enfermedad, un trastorno o un síntoma existente.

Como se usa en la presente, y con referencia a un análogo de incretina, "actividad agonista triple" significa un análogo de incretina con actividad en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón, especialmente un análogo que tiene una actividad equilibrada y suficiente en cada receptor para proporcionar los beneficios del agonismo de ese receptor al mismo tiempo que evita los efectos secundarios no deseados asociados con demasiada actividad. Además, los análogos de incretina que tienen actividad agonista triple tienen una duración de acción extendida en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón, lo que permite, de manera ventajosa, dosificar una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana.

Como se usa en la presente, "tratamiento" o "tratar" significa restringir, desacelerar, detener o revertir la progresión o gravedad de una condición, una enfermedad, un trastorno o un síntoma existente.

Como se usa en la presente, y con referencia a un análogo de incretina, "actividad agonista triple" significa un análogo de incretina con actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GIP y GLP-1, especialmente un análogo que tiene una actividad equilibrada y suficiente en cada receptor para proporcionar los beneficios del agonismo de ese receptor al mismo tiempo que evita los efectos secundarios no deseados asociados con demasiada actividad. Además, los análogos de incretina que tienen actividad agonista triple tienen una duración de acción extendida en cada uno de los receptores de glucagón, GIP y GLP-1, lo que permite, de manera ventajosa, la dosificación tan poco frecuente como una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana.

Análogos de incretina

Las características estructurales de los análogos de incretina que se describen en la presente dan como resultado análogos que tienen actividad suficiente en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón para obtener los efectos favorables de la actividad en cada receptor (es decir, actividad agonista triple), pero no demasiada actividad en cualquiera de los receptores puede abrumar la actividad en cualquiera de los dos receptores o dar lugar a efectos secundarios no deseados cuando se administra en una dosis suficiente para dar como resultado la actividad en los tres receptores. Los ejemplos no limitativos de tales características estructurales en ciertas formas de

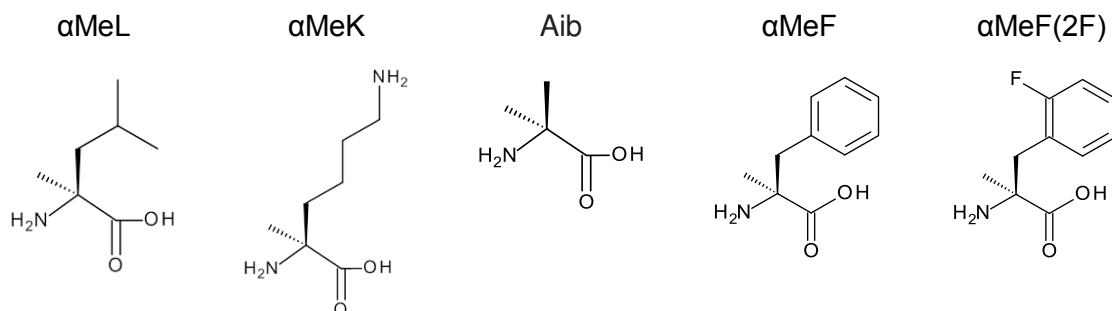
realización, y con referencia a la SEQ ID NO: 5, incluyen α MeF o α MeF (2F) en la posición 6, que se descubrió que contribuye a una actividad óptima del glucagón, L o α MeL en la posición 13, que se descubrió que contribuye a una actividad óptima del glucagón y GIP; Aib en la posición 20, que se descubrió que contribuye a una actividad óptima de GIP; acilación en la posición 17, que se descubrió que contribuye a una actividad óptima del glucagón; e Y en la posición 25, que se encontró que contribuye a una actividad óptima del glucagón y/o GIP. Otros ejemplos de tales características estructurales incluyen los aminoácidos descritos en la presente en las posiciones 22, 24 y 28-39, que se descubrió que contribuyen a una fijación y una potencia óptimas en los tres receptores.

Las características estructurales de los análogos de incretina descritos en la presente también dan como resultado análogos que tienen muchas otras propiedades beneficiosas y relevantes para su capacidad de desarrollo como tratamientos terapéuticos, que incluyen mejorar la solubilidad de los análogos en soluciones acuosas, mejorar la estabilidad química y física de la formulación, extender el perfil farmacocinético, y minimizar el potencial de inmunogenicidad. Los ejemplos no limitativos de determinadas características estructurales que dan lugar a tales atributos incluyen la acilación en la posición 17 con un ácido graso C_{20} , que contribuye a perfiles farmacocinéticos (PK) y capacidad de desarrollo óptimos; Aib o H en la posición 20, que contribuye a los perfiles PK y capacidad de desarrollo óptimos; y los aminoácidos descritos en la presente en las posiciones 22, 24 y 28-39, que contribuyen a un PK, una inmunogenicidad, una capacidad de desarrollo y una estabilidad óptimos.

Cabe señalar que las listas anteriores de características estructurales son ejemplificativas y no exhaustivas, y que la combinación de características beneficiosas de los análogos de ejemplo descritos en la presente no es el resultado de ninguna modificación aislada, sino que se logra a través de las nuevas combinaciones de las características estructurales descritas en la presente. Además, los efectos descritos anteriormente de las listas de modificaciones anteriores no son exclusivos, ya que muchas de estas modificaciones también tienen otros efectos importantes para las características de los compuestos descritos en la presente, como se describe a continuación.

Las secuencias de aminoácidos de los análogos de incretina descritas en la presente incorporan aminoácidos naturales, típicamente representados en la presente mediante el uso de códigos estándar de una letra (por ejemplo, L = leucina), así como residuos alfa-metil sustituidos de aminoácidos naturales (por ejemplo, α -metil leucina

(α MeL), α -metil lisina (α MeK), α -metil fenilalanina (α MeF), y α -metil 2-fluorofenilalanina (α MeF(2F)), y algunos otros aminoácidos no naturales, por ejemplo, ácido alfa-aminoisobutírico (Aib). Las estructuras de estos aminoácidos se representan a continuación:



Como se señaló anteriormente, los análogos de incretina que se describen en la presente tienen similitudes estructurales, pero muchas diferencias estructurales, con respecto a cualquiera de los péptidos humanos nativos. Por ejemplo, cuando se compara con el GIP humano nativo (SEQ ID NO: 4), los análogos de incretina descritos en la presente incluyen modificaciones en una o más de las posiciones 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 18-21, 23-25, 28-29 y 30-42. En algunos casos, los análogos de incretina descritos en la presente incluyen modificaciones a los aminoácidos del GIP humano nativo (SEQ ID NO: 4) en cada una de las posiciones 2, 3, 6, 7, 13, 14, 17, 18, 21, 23, 25, 29 y 30-42. En ciertos casos, los análogos de incretina descritos en la presente incluyen las siguientes modificaciones de aminoácidos: Aib en la posición 2; Q o H en la posición 3; α MeF o α MeF(2F) en la posición 6; T en la posición 7; L o α MeL en la posición 13; L en la posición 14; un residuo K modificado en la posición 17 que está modificado a través de la conjugación con el grupo epsilon-amino de la cadena lateral K con un ácido graso C_{16} a C_{22} , opcionalmente mediante el uso de un ligador; A en la posición 18; Q en la posición 19; Aib, Q o H en la posición 20; A en la posición 21; I en la posición 23; E en la posición 24; Y en la posición 25; E en la posición 28; G en la posición 29; y reemplazo de los aminoácidos en las posiciones 30-42 con la siguiente secuencia de aminoácidos: GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 12) (y análogos truncados de la cola). Incluso en otros casos, los análogos de incretina descritos en la presente están amidados. Además de las modificaciones descritas en la presente, los análogos de incretina descritos en la presente pueden incluir una o más modificaciones de aminoácidos adicionales, sin embargo, siempre que los análogos sigan siendo capaces de fijarse y activar cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón.

Como se señaló anteriormente, los análogos de incretina descritos en la presente

incluyen una porción ácido graso conjugada, por ejemplo, por medio de un ligador a un aminoácido natural o no natural con un grupo funcional disponible para la conjugación. Dicha conjugación a veces se denomina acilación. En ciertos casos, el aminoácido con un grupo funcional disponible para la conjugación puede ser K, C, E y D. En casos particulares, el aminoácido con un grupo funcional disponible para la conjugación es K, donde la conjugación es al grupo epsilon-amino de la cadena lateral K.

La acilación de los análogos de incretina descritos en la presente se encuentra en la posición 17 en la SEQ ID NO: 5, que se determinó que es la ubicación óptima para la inclusión de esta estructura. El ácido graso, y en ciertas formas de realización el ligador, actúan como aglutinantes de albúmina, y proporcionan el potencial para generar compuestos de acción extendida.

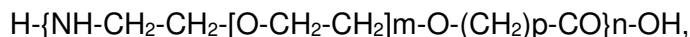
Los análogos de incretina descritos en la presente utilizan un ácido graso C₁₆-C₂₂ conjugado químicamente con el grupo funcional de un aminoácido, ya sea por un enlace directo o mediante un ligador. La longitud y la composición del ácido graso afectan la vida media de los análogos de incretina, su potencia en modelos animales *in vivo* y su solubilidad y estabilidad. La conjugación a un monoácido o diácido graso saturado C₁₆-C₂₂ da como resultado análogos de incretina que exhiben una vida media deseable, una potencia deseable en modelos animales *in vivo* y características de solubilidad y estabilidad deseables.

Los ejemplos de ácidos grasos saturados C₁₆-C₂₂ para uso en la presente incluyen, entre otros, ácido palmítico (ácido hexadecanoico) (monoácido C₁₆), ácido hexadecandioico (diácido C₁₆), ácido margárico (ácido heptadecanoico) (monoácido C₁₇), ácido heptadecandioico (diácido C₁₇), ácido esteárico (monoácido C₁₈), ácido octadecandioico (diácido C₁₈), ácido nonadecílico (ácido nonadecanoico) (monoácido C₁₉), ácido nonadecandioico (diácido C₁₉), ácido araquídico (ácido eicosanoico) (monoácido C₂₀), ácido eicosandioico (diácido C₂₀), ácido heneicosílico (ácido heneicosanoico) (monoácido C₂₁), ácido heneicosandioico (diácido C₂₁), ácido behénico (ácido docosanoico) (monoácido C₂₂), ácido docosandioico (diácido C₂₂), incluidos los derivados ramificados y sustituidos de estos.

En ciertos casos, el ácido graso C₁₆-C₂₂ puede ser un monoácido saturado C₁₈, un diácido saturado C₁₈, un monoácido saturado C₁₉, un diácido saturado C₁₉, un monoácido saturado C₂₀, un diácido saturado C₂₀, y derivados ramificados y sustituidos de estos. En los casos más particulares, el ácido graso C₁₆-C₂₂ puede ser ácido esteárico, ácido araquídico o ácido eicosandioico, especialmente ácido araquídico.

En algunos casos, el ligador puede tener de uno a cuatro aminoácidos, un amino

carboxilato de polietilenglicol, o mezclas de estos. En ciertos casos, el amino carboxilato de polietilenglicol tiene la siguiente estructura:



donde m es cualquier número entero de 1 a 12, n es cualquier número entero de 1 a 12, y p es 1 o 2.

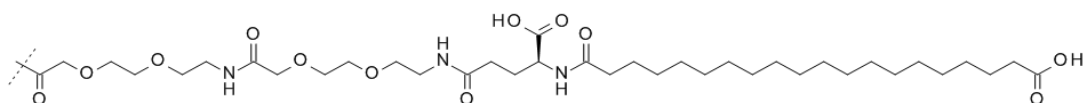
En ciertos casos, el ligador puede tener una o más porciones (2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilo), opcionalmente en combinación con uno a cuatro aminoácidos.

En los casos en que el ligador incluye al menos un aminoácido, el aminoácido puede ser de uno a cuatro residuos de aminoácidos Glu o γ Glu. En algunos casos, el ligador puede incluir uno o dos residuos de aminoácidos Glu o γ Glu, incluidas las formas D de estos. Por ejemplo, el ligador puede incluir uno o dos residuos de aminoácidos γ Glu. Alternativamente, el ligador puede incluir de uno a cuatro residuos de aminoácidos (como, por ejemplo, aminoácidos Glu o γ Glu) utilizados en combinación con hasta treinta y seis porciones (2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilo). Específicamente, el ligador puede ser una combinación de uno a cuatro aminoácidos E o γ E y de una a cuatro porciones (2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilo). En otros casos, el ligador puede ser una combinación de uno o dos aminoácidos γ Glu y una o dos porciones (2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilo).

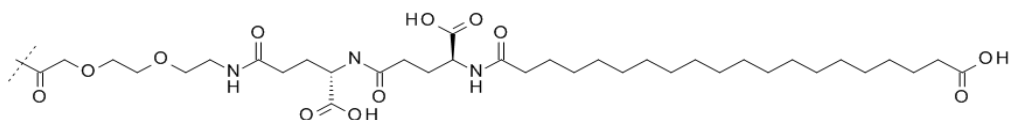
En un caso específico, los análogos de incretina descritos en la presente tienen componentes ligadores y ácidos grasos que tienen la estructura de la siguiente fórmula:



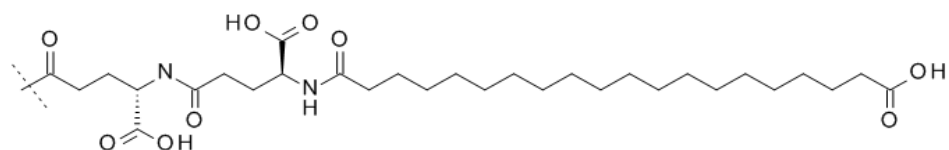
donde a es 0, 1 o 2, b es 1 o 2, y c es 16 o 18. En un caso particular, a es 2, b es 1 y c es 18, cuya estructura se muestra a continuación:



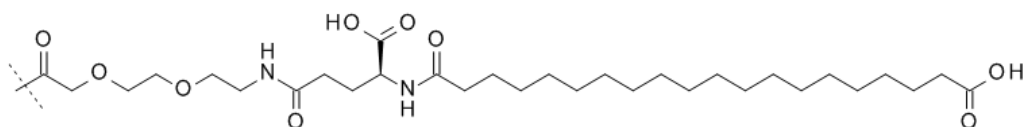
En otro caso específico, a es 1, b es 2 y c es 18, cuya estructura se muestra a continuación:



En otro caso específico, a es 0, b es 2 y c es 18, cuya estructura se muestra a continuación:



En otro caso específico, a es 1, b es 1 y c es 18, cuya estructura se muestra a continuación:



Como se muestra en las estructuras químicas de los Ejemplos 1-6 siguientes, las porciones ligador-ácido graso descritas anteriormente se pueden vincular al grupo épsilon (ϵ)-amino de la cadena lateral de lisina (K).

La afinidad de los análogos de incretina descritos en la presente para cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón puede medirse mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica para medir los niveles de fijación al receptor, incluidas, por ejemplo, las descritas en los ejemplos a continuación, y comúnmente se expresa como un valor de la constante de inhibición (K_i). La actividad de los análogos de incretina descritos en la presente en cada uno de los receptores también se puede medir mediante el uso de técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, los ensayos de actividad *in vitro* descritos a continuación, y se expresa comúnmente como un valor de concentración eficaz 50 (EC_{50}), que es la concentración del compuesto que causa la simulación máxima media en una curva de respuesta a la dosis.

Los análogos de incretina descritos en la presente pueden formularse como composiciones farmacéuticas, que se pueden administrar por vías parenterales (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o transdérmica). Dichas composiciones farmacéuticas y las técnicas para prepararlas se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Troy, Ed., 21.a ed., Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). En casos particulares, los análogos de incretina se administran por vía subcutánea.

Los análogos de incretina descritos en la presente pueden reaccionar con cualquiera de una serie de ácidos/bases inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición ácida/básica aceptables desde el punto de vista farmacéutico. Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico y las técnicas comunes para su

preparación se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Stahl, *et al.* Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2ª edición revisada (Wiley-VCH, 2011)). Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico para su uso en esta invención incluyen sales de sodio, de trifluoroacetato, de clorhidrato y de acetato.

La divulgación también proporciona y, por lo tanto, abarca nuevos intermediarios y métodos para sintetizar los análogos de incretina descritos en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos. Los intermediarios y los análogos de incretina descritos en la presente pueden prepararse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, un método que utiliza síntesis química se ilustra en los ejemplos a continuación. Los pasos sintéticos específicos para cada una de las vías descritas se pueden combinar de diferentes maneras para preparar los análogos de incretina descritos en la presente. Las personas del oficio de nivel medio pueden acceder con facilidad a los reactivos y los materiales de inicio.

Ciertos análogos de incretina descritos en la presente son generalmente eficaces en un amplio rango de dosis. Por ejemplo, las dosis para una administración de una vez por semana pueden estar dentro de un rango de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg/ persona/semana, dentro de un rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/persona/semana o incluso dentro de un rango de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 3 mg/persona/semana. Por lo tanto, los análogos de incretina descritos en la presente se pueden administrar diariamente, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana, especialmente una vez por semana.

Métodos

Los análogos de incretina descritos en la presente pueden usarse para tratar una variedad de afecciones, trastornos, enfermedades o síntomas. En particular, se proporcionan métodos para tratar la T2DM en un individuo, donde dichos métodos incluyen al menos una etapa de administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Además, se proporcionan métodos para tratar la obesidad en un individuo, donde dichos métodos incluyen al menos una etapa de administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Además, se proporcionan métodos para inducir la pérdida de peso no terapéutica en un individuo, donde dichos métodos incluyen al menos una etapa de administrar a

un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Además, se proporcionan métodos para tratar el síndrome metabólico en un individuo, donde dichos métodos incluyen al menos una etapa de administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Además, se proporcionan métodos para tratar la NASH en un individuo, donde dichos métodos incluyen al menos una etapa de administrar a un individuo que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Además, se proporcionan métodos para tratar la FLD en un individuo, donde dichos métodos incluyen al menos una etapa de administrar a un sujeto que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un análogo de incretina descrito en la presente, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En estos métodos, la efectividad de los análogos de incretina se puede evaluar, por ejemplo, si se observa una reducción significativa en la glucosa en sangre, si se observa un aumento significativo en la insulina, si se observa una reducción significativa en la HbA1c y/o si se observa una reducción significativa en el peso corporal.

De manera alternativa, los análogos de incretina descritos en la presente o las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de estos se pueden usar para mejorar la resistencia ósea en un individuo que lo necesite. En algunos casos, el individuo que lo necesita tiene hipoostosis o hipoosteoidosis, o se está curando de una fractura ósea, una cirugía ortopédica, un implante de prótesis, implante dental, y/o fusión espinal. Los análogos de incretina descritos en la presente también pueden usarse para el tratamiento de otros trastornos tales como la enfermedad de Parkinson o la enfermedad de Alzheimer.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos no limitativos se ofrecen a los fines ilustrativos, no limitativos.

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

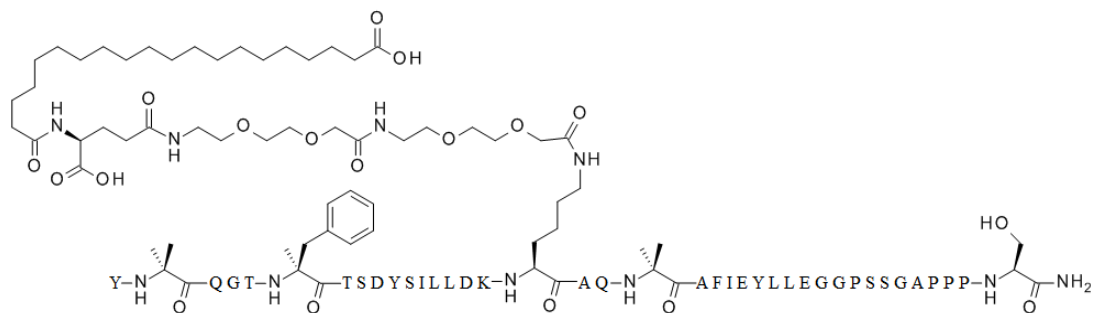
Ejemplo 1:

El Ejemplo 1 es un compuesto representado por la siguiente descripción:

Y-Aib-QGT- α MeF-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ Glu)-

CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 6).

A continuación se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 1 y se utilizan los códigos de aminoácidos estándar de una sola letra, con la excepción de los residuos Aib2, αMeF6, K17 y Aib20, donde se han expandido las estructuras de estos residuos de aminoácidos:



La estructura principal peptídica del Ejemplo 1 se sintetiza utilizando la química de fluorenimetiloxycarbonilo (Fmoc)/terc-butilo (t-Bu) en un sintetizador de péptidos Symphony X (Protein Technologies, Inc. Tucson, AZ).

La resina consiste en un 1 % de poliestireno reticulado DVB (Fmoc-Rink-MBHA Low Loading Resin, 100-200 mesh, EMD Millipore) en una sustitución de 0,3-0,4 meq/g. Se utilizan grupos protectores de cadena lateral estándar. Fmoc-Lys (Mtt)-OH se usa para la lisina en la posición 17, y Boc-Tyr (tBu)-OH se usa para la tirosina en la posición 1. Los grupos Fmoc se eliminan antes de cada etapa de acoplamiento (2 x 7 minutos) utilizando 20 % de piperidina en DMF. Todos los acoplamientos estándar de aminoácidos se realizan durante 1 hora a una amina primaria y 3 horas a una amina secundaria, utilizando una relación molar igual de Fmoc aminoácido (0,3 mM), diisopropilcarbodiimida (0,9 mM) y Oxyma (0,9 mM), en un exceso molar de 9 veces sobre la carga teórica de péptidos. Las excepciones son los acoplamientos a los aminoácidos α metilados en C, que se acoplan durante 3 horas. Una vez completada la síntesis de la estructura principal peptídica, la resina se lava exhaustivamente con DCM 6 veces para eliminar la DMF residual. El grupo protector Mtt en la lisina en la posición 17 se elimina selectivamente de la resina peptídica utilizando dos tratamientos de hexafluoroisopropanol al 30 % (Oakwood Chemicals) en DCM (tratamiento de 2 x 40 minutos).

La unión posterior de la porción ligador-ácido graso se logra mediante el acoplamiento del ácido acético 2-[2-(2-Fmoc-amino-etoxi)-etoxi] (Fmoc-AEEA-OH, ChemPep, Inc.), Fmoc ácido glutámico αβ -éster butílico (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.), ácido mono-otBu-eicosandioico (WuXi AppTec, Shanghai, China). Se utiliza un

exceso de reactivo en una serie de 3 veces (AA: PyAOP: DIPEA = 1:1:1 mol/mol) para cada acoplamiento que dura 1 hora.

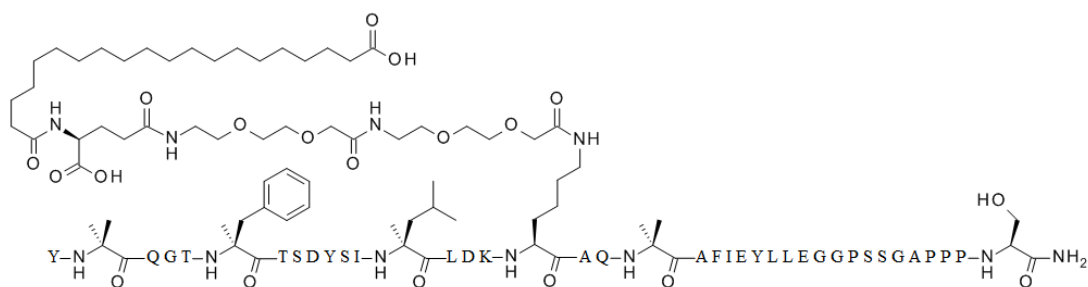
Una vez que se completa la síntesis, la resina peptídica se lava con DCM y luego se seca completamente al aire. La resina seca se trata con 10 ml de cóctel de escisión (ácido trifluoroacético:agua:triisopropilsilano, 95:2,5:2,5 v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se separa por filtración, se lava dos veces, cada una con 2 ml de TFA puro y los filtrados combinados se tratan con dietil éter frío 5 veces (-20°C) para precipitar el péptido crudo. La suspensión de péptido/éter se centrifuga luego a 3500 rpm durante 2 minutos para formar un pélet sólido, se decanta el sobrenadante y el pélet sólido se tritura con éter dos veces más y se seca al vacío. El péptido crudo se solubiliza en 20 % de acetonitrilo/20 % de ácido acético/60 % de agua y se purifica por RP-HPLC en una columna preparativa de fenil-hexilo de Luna 5 μm (21 x 250 mm, Phenomenex) con gradientes lineales de acetonitrilo al 100 % y sistema de amortiguación TFA/agua al 0,1 % (acetonitrilo al 30-50 % en 60 min). La pureza del péptido se evalúa utilizando RP-HPLC analítica y los criterios de agrupación son > 95 %. Se descubre que la pureza de la agrupación principal del Ejemplo 1 es 99,2 %. La liofilización posterior de la agrupación de producto principal final produce una sal de TFA peptídica liofilizada. El peso molecular se determina por LC-MS (obsd: $M+4H^+/4 = 1219.9$; Calc $M+4H^+/4 = 1220.1$).

Ejemplo 2:

El Ejemplo 2 es un compuesto representado por la siguiente descripción:

Y-Aib-QGT- αMeF -TSDYSI- αMeL -LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 7).

A continuación se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 2 y se utilizan los códigos de aminoácidos estándar de una sola letra con la excepción de los residuos Aib2, αMeF6 , αMeL13 , K17 y Aib20, donde se han expandido las estructuras de estos residuos de aminoácidos:



Se utilizan procesos similares a los descritos anteriormente para el Ejemplo 1

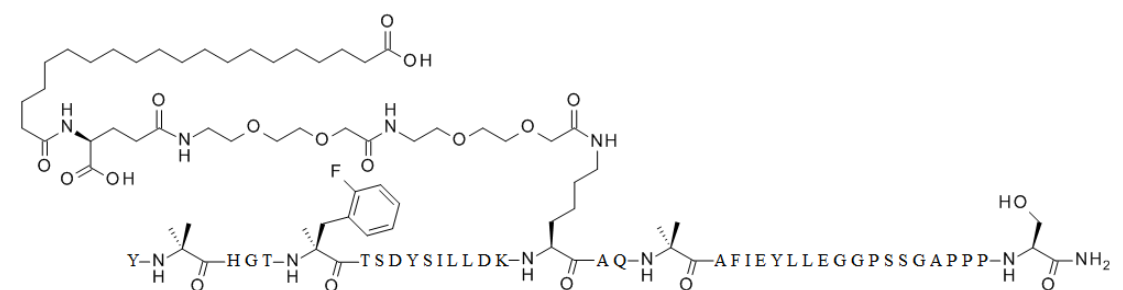
para sintetizar la estructura principal peptídica, para conjugar la porción ligador-ácido graso, para examinar la pureza y para confirmar el peso molecular del Ejemplo 2.

Ejemplo 3:

El ejemplo 3 es un compuesto representado por la siguiente descripción:

Y-Aib-HGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 8).

A continuación se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 3 y se utilizan los códigos de aminoácidos estándar de una sola letra con la excepción de los residuos Aib2, α MeF(2F)6, K17 y Aib20, donde se han expandido las estructuras de estos residuos de aminoácidos:



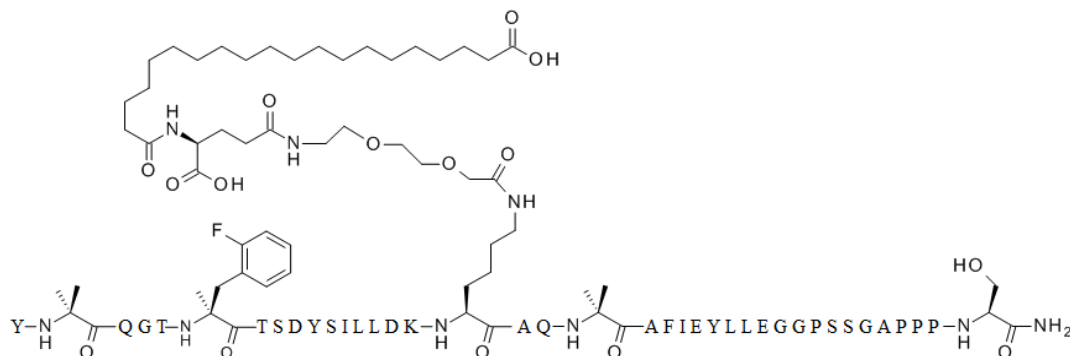
Se utilizan procesos similares a los descritos anteriormente para el Ejemplo 1 para sintetizar la estructura principal peptídica, para conjugar la porción ligador-ácido graso, para examinar la pureza y para confirmar el peso molecular del Ejemplo 3.

Ejemplo 4:

El ejemplo 4 es un compuesto representado por la siguiente descripción:

Y-Aib-QGT- α MeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 9).

A continuación se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 4 y se utilizan los códigos de aminoácidos estándar de una sola letra con la excepción de los residuos Aib2, α MeF(2F)6, K17 y Aib20, donde se han expandido las estructuras de estos residuos de aminoácidos:



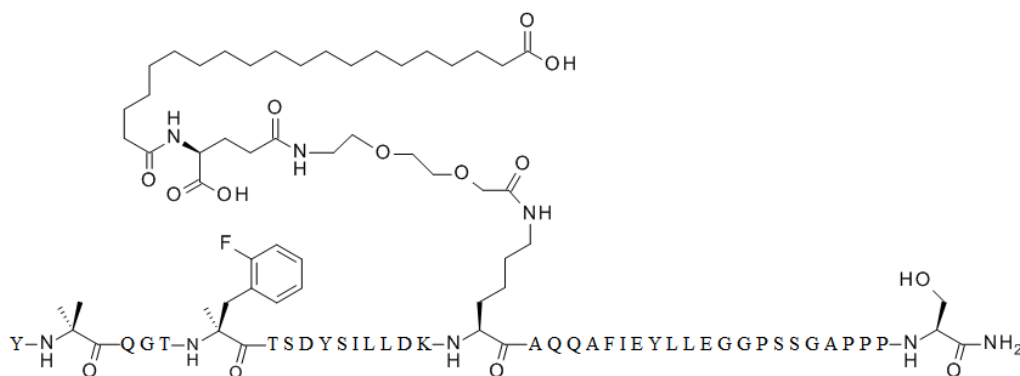
Se utilizan procesos similares a los descritos anteriormente para el Ejemplo 1 para sintetizar la estructura principal peptídica, para conjugar la porción ligador-ácido graso, para examinar la pureza y para confirmar el peso molecular del Ejemplo 4.

Ejemplo 5:

El ejemplo 5 es un compuesto representado por la siguiente descripción:

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 10).

A continuación se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 5 y se utilizan los códigos de aminoácidos estándar de una sola letra con la excepción de los residuos Aib₂, αMeF(2F)₆ y K₁₇, donde se han expandido las estructuras de estos residuos de aminoácidos:



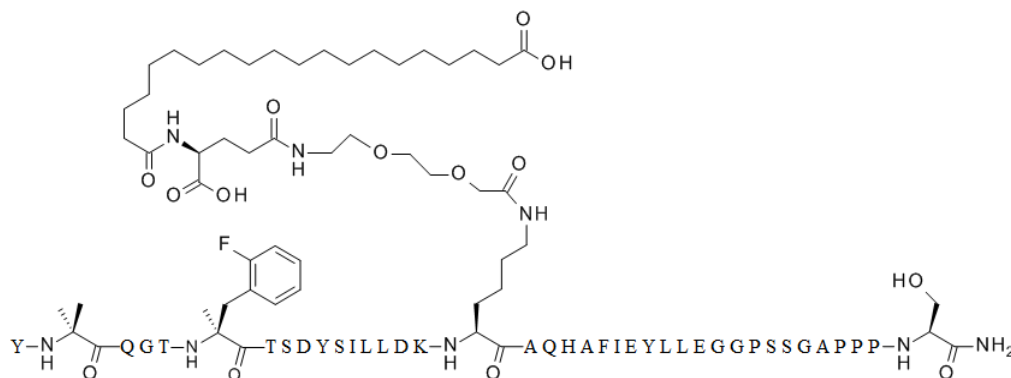
Se utilizan procesos similares a los descritos anteriormente para el Ejemplo 1 para sintetizar la estructura principal peptídica, para conjugar la porción ligador-ácido graso, para examinar la pureza y para confirmar el peso molecular del Ejemplo 5.

Ejemplo 6:

El ejemplo 6 es un compuesto representado por la siguiente descripción:

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO: 11).

A continuación se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 6 y se utilizan los códigos de aminoácidos estándar de una sola letra con la excepción de los residuos Aib2, α MeF(2F)6 y K17, donde se han expandido las estructuras de estos residuos de aminoácidos:



Se utilizan procesos similares a los descritos anteriormente para el Ejemplo 1 para sintetizar la estructura principal peptídica, para conjugar la porción ligador-ácido graso, para examinar la pureza y para confirmar el peso molecular del Ejemplo 6.

FUNCIÓN *IN VITRO*

Afinidad de fijación:

Se llevan a cabo ensayos de fijación competitiva de radioligandos para determinar la constante de disociación de equilibrio para los compuestos de Ejemplo y las moléculas comparadoras. Dicho ensayo utiliza métodos de ensayo de proximidad por centelleo (SPA) y membranas preparadas a partir de células HEK293 transfectadas que sobreexpresan el receptor GLP humano (GIPR), el receptor GLP-1 (GLP-1R) o el receptor de glucagón humano (GcgR).

Los ensayos se realizan en presencia de bacitracina como agente bloqueador no específico para evitar que las porciones aciladas de los análogos de prueba se fijen a los componentes de proteínas utilizados en los amortiguadores de ensayo estándar (por ejemplo, albúmina).

Las curvas de competencia se representan como el porcentaje de inhibición específica (eje y) frente a la concentración logarítmica del compuesto (eje x) y se analizan mediante un ajuste de regresión no lineal de cuatro parámetros con pendiente variable (ABase o Genedata). Los valores de K_i se calculan de acuerdo con la ecuación $K_i = IC_{50}/(1+(D/K_d))$, donde IC_{50} es la concentración del compuesto que produce una inhibición de fijación del 50 %, D es la concentración de radioligando utilizada en el ensayo y K_d es la constante de disociación de equilibrio para el receptor y el radioligando, determinada a partir del análisis de fijación de saturación (que se muestra

en la Tabla 1 a continuación).

Tabla 1. Constantes de disociación de equilibrio (K_d) determinadas a partir del análisis de fijación de saturación.

K_d , nM		
GLP-1R	GcgR	GIPR
1,2	3,9	0,14

Los valores de K_i de los análogos y moléculas comparadoras de ejemplo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Afinidad de fijación *in vitro* (K_i) de los Ejemplos y Comparadores para GIPR, GLP-1R y GcgR humanos.

Molécula	K_i , nM (SEM, n)		
	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	3,1 (0,5, 4)		
hGIP		0,12 (0,02, 4)	
hGLP-1			1,2 (0,2, 4)
Ejemplo 1	0,955 (0,182, 3)	0,0278 (0,00297, 3)	2,51 (0,930, 3)
Ejemplo 2	1,49 (0,201, 3)	0,0413 (0,0129, 3)	2,41 (se = 0,720, 3)
Ejemplo 3	0,469 (0,121, 5)	0,0684 (0,0193, 5)	1,66 (se = 0,950, 5)
Ejemplo 4	0,637 (0,0319, 3)	0,0832 (0,0273, 3)	1,21 (se = 0,0737, 3)
Ejemplo 5	0,419 (0,0430, 4)	0,0347 (0,0112, 4)	1,17 (se = 0,674, 4)
Ejemplo 6	0,382 (0,0587, 4)	0,0388 (0,00813, 4)	0,822 (se = 0,379, 4)

NOTA: Un calificador (>) indica que los datos no alcanzaron el 50 % de inhibición en relación con la fijación máxima, por lo que la K_i se calculó utilizando la concentración más alta probada en el ensayo. n = 1/x significa que solo se utiliza un valor del número total de réplicas (x) para expresar la media. SEM solo se calcula cuando n = 2 o cuando existen resultados no calificados mayores.

Como se ve en la Tabla 2, los análogos de ejemplo tienen afinidad de fijación en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 y Gcg.

Actividad funcional:

La actividad funcional se determina en las líneas celulares clonales HEK-293 que expresan GIP-R GLP-1R- y GcgR. Cada línea celular que sobreexpresa el receptor se trata con péptido (20 puntos CRC, 2,75 veces dilución directa Labcyte Echo) en DMEM (Gibco Cat# 31053) suplementado con 1X GlutaMAX™ (Gibco Cat# 35050), FBS al 0,25 % (Fetal Bovine Serum, Gibco Cat# 26400), 0,05 % de fracción V BSA (Bovine Serum Albumin, Gibco Cat# 15260), IBMX 250 μ M y HEPES 20 mM (Gibco Cat# 15630) en un

volumen de ensayo de 20 µl.

Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, el aumento resultante en cAMP intracelular se determina cuantitativamente utilizando el kit de ensayo CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Brevemente, los niveles de cAMP dentro de la célula se detectan agregando el conjugado cAMP-d2 en el amortiguador de lisis celular seguido del anticuerpo anti-cAMP-Eu³⁺-Criptato, también en el amortiguador de lisis celular. El ensayo competitivo resultante se incuba durante al menos 60 minutos a temperatura ambiente y luego se detecta utilizando un instrumento PerkinElmer Envision® con una excitación a 320 nm y una emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades de visualización (emisión a 665nm/620nm*10.000) son inversamente proporcionales a la cantidad de cAMP presente y se convirtieron a cAMP nM por cavidad utilizando una curva estándar de cAMP.

La cantidad de cAMP generado (nM) en cada cavidad se convierte en un porcentaje de la respuesta máxima observada con cualquiera de GLP-1 humano (7-36)NH₂, Gcg humano o GIP humano (1-42)NH₂. Un valor relativo EC₅₀ se deriva por análisis de regresión no lineal utilizando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido añadido, ajustado a una ecuación logística de cuatro parámetros.

Los datos para los análogos de ejemplo y hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂ y hGcg se muestran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Potencia funcional de cAMP (EC₅₀) para análogos y comparadores de ejemplo en presencia de FBS y BSA.

	cAMP EC ₅₀ , nM (SEM, n)		
	GcgR	GIPR	GLP-1R
hGcg	0,0114 (0,0014, 12)		
gGIP amida		0,0979 (0,0088, 12)	
hGLP-1 amida			0,0424 (0,0043, 12)
Ejemplo 1	6,33 (0,905, 3)	1,82 (0,332, 3)	12,6 (1,42, 3)
Ejemplo 2	4,75 (0,827, 3)	1,34 (0,216, 3)	11,6 (2,26, 3)
Ejemplo 3	3,46 (0,835, 7)	1,37 (0,518, 7)	13,1 (3,06, 7)
Ejemplo 4	1,78 (0,400, 5)	1,37 (0,422, 5)	10,6 (3,29, 5)
Ejemplo 5	1,87 (0,254, 5)	1,91 (0,618, 5)	13,0 (2,59, 5)
Ejemplo 6	1,76 (0,218, 4)	1,41 (0,363, 4)	8,94 (2,76, 4)

NOTA: La determinación de EC₅₀ de GLP-1(7-36)NH₂ en GLP-1R humano, Gcg humana en GCGR humano, y GIP(1-42)NH₂ humano en GIP-R humano: los rangos de concentración de péptidos fueron de 448 pM a 99,5 nM. La determinación de EC₅₀ de

los Ejemplos en GLP-1R humano, GcgR humano y GIP-R humano: los rangos de concentración del péptido fueron de 51,5 fM a 11,4 μ M.

Como se ve en la Tabla 3, en presencia de FBS y BSA, los análogos de ejemplo tienen actividades agonistas según lo determinan los ensayos de cAMP GIP-R, GLP-1R y GcgR humanos, que son más bajos que los ligandos nativos.

Un conjunto adicional de ensayos de cAMP se lleva a cabo en células HEK293 que expresan los receptores humanos de GLP-1, GIP y glucagón. Mediante el uso de métodos de fluorescencia homogénea de resolución temporal, los ensayos se llevaron a cabo para determinar la potencia intrínseca de los análogos de ejemplo y las moléculas comparadoras realizada en presencia de caseína (en lugar de albúmina de suero) como un bloqueador no específico, que no interactúa con las porciones ácido graso de las moléculas analizadas.

Los niveles de cAMP intracelular se determinan mediante extrapolación utilizando una curva estándar. Las curvas de respuesta a la dosis de los compuestos se representan como el porcentaje de estimulación normalizada a los valores mínimo (solo amortiguador) y máximo (concentración máxima de cada ligando de control) y se analizan mediante un ajuste de regresión no lineal de cuatro parámetros con una pendiente variable (Genedata Screener 13). EC₅₀ es la concentración del compuesto que causa la simulación máxima media en una curva de respuesta a la dosis.

Los datos se proporcionan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4. Activación funcional de hGLP-1R, hGIPR, hGcgR en presencia de caseína al 0,1 %.

	cAMP EC ₅₀ , nM (SEM, n)		
	GcGR	GIPR	GLP-1R
hGcg	0,0119 (0,00356, 163)		
hGIP amida		0,154 (0,037, 118)	
gGLP-1 amida			0,063 (0,022, 197)
Ejemplo 1	0,158 (0,0464, 6)	0,0226 (0,00787, 5)	0,112 (0,0250, 5)
Ejemplo 2	0,0960 (0,0295, 7)	0,0329 (0,0136, 7)	0,106 (0,0155, 7)
Ejemplo 3	0,0301 (0,00811, 5)	0,0215 (0,00338, 4)	0,104 (0,0300, 4)
Ejemplo 4	0,0296 (0,00628, 5)	0,0321 (0,0110, 4)	0,145 (0,0309, 4)
Ejemplo 5	0,0343 (0,00555, 4)	0,0306 (0,00998, 5)	0,103 (0,0263, 4)
Ejemplo 6	0,0293 (0,00562, 4)	0,0349 (0,00643, 4)	0,115 (0,0305, 4)

Como se ve en la Tabla 4, los análogos de ejemplo estimulan el cAMP de los

receptores GIP, GLP-1 y glucagón humanos en presencia de caseína al 0,1 %.

SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1 - glucagón humano

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO: 2 - amida de GLP-1 humano (7-36)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH₂

SEQ ID NO: 3 - OXM humano

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

SEQ ID NO: 4 - GIP humano

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO: 5 - análogo de incretina

YX₂X₃GTX₆TSDYSIX₁₃LDKX₁₇AQX₂₀AFIEYLLEGGPSSGAPPPS

donde

X₂ es Aib;

X₃ es Q o H;

X₆ es αMeF o αMeF(2F);

X₁₃ es L o αMeL;

X₁₇ es cualquier aminoácido con un grupo funcional disponible para la conjugación, en donde el grupo funcional está conjugado con un ácido graso C₁₆-C₂₂;

X₂₀ es Aib, Q o H

SEQ ID NO: 6 - análogo de incretina

Y-Aib-QGT-αMeF-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 7 - análogo de incretina

Y-Aib-QGT-αMeF-TSDYSI-αMeL-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 8 - análogo de incretina

Y-Aib-HGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 9 - análogo de incretina

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-AFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 10 - análogo de incretina

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)-(γGlu)-CO-

(CH₂)₁₈-CO₂H)AQQAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 11 - análogo de incretina

Y-Aib-QGT-αMeF(2F)-TSDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)-(γGlu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQHAFIEYLLEGGPSSGAPPPS-NH₂

SEQ ID NO: 12 - secuencia artificial

GPSSGAPPPS