

COMPUESTOS AGONISTAS DE GIPR

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad en el receptor de polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) humano. La presente invención se refiere además a compuestos que tienen una duración de acción prolongada en el receptor de GIP. Los compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 ("T2DM"). Además, los compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de la obesidad.

En las últimas décadas, la prevalencia de la diabetes siguió aumentando. La T2DM es la forma más común de diabetes, y representa aproximadamente 90 % de todos los tipos de diabetes. La T2DM se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre asociados principalmente con la resistencia a la insulina. El tratamiento de referencia para la T2DM incluye dieta y ejercicio, tratamiento con medicamentos orales y fármacos inyectables para reducir la glucosa, incluidos los tratamientos a base de incretina, tales como los agonistas del receptor de GLP-1. Actualmente, hay disponible una variedad de agonistas del receptor de GLP-1 para el tratamiento de la T2DM, aunque los agonistas del receptor de GLP-1 comercializados en la actualidad son en general de dosis limitada debido a efectos secundarios gastrointestinales, tales como náuseas y vómitos.

La inyección subcutánea es la vía de administración típica para los agonistas del receptor de GLP-1 disponibles. Cuando el tratamiento con medicamentos orales y los tratamientos a base de incretina son insuficientes, se considera el tratamiento con insulina. A pesar de los avances en el tratamiento disponibles en la actualidad, muchos pacientes con T2DM no pueden alcanzar sus objetivos de control glucémico. La diabetes no controlada conduce a varias afecciones asociadas con el aumento de la morbilidad y la mortalidad de los pacientes.

Existe una necesidad de un tratamiento que permita que más pacientes con T2DM alcancen sus objetivos de tratamiento glucémico.

La obesidad es un trastorno médico complejo que da como resultado una acumulación excesiva de masa de tejido adiposo. En la actualidad, la obesidad es un problema de salud pública mundial que se asocia con resultados de salud no deseados y morbilidades. Los tratamientos deseados para pacientes con obesidad deberían reducir el exceso de peso corporal, mejorar las comorbilidades relacionadas con la obesidad y mantener la reducción de peso a largo plazo. Los tratamientos disponibles para la obesidad son insatisfactorios particularmente para los pacientes con obesidad grave. Existe una necesidad de opciones de tratamiento alternativas para inducir la pérdida de peso terapéutica en pacientes que necesitan dicho tratamiento.

WO2016/111971 describe péptidos que se afirma que tienen actividades agonistas de GLP-1R y GIPR. WO2013/164483 también divulga compuestos que se afirma que tienen actividades de GLP-1R y GIPR.

WO2018/181864 divulga compuestos que se afirma que tienen actividad agonista de GIPR.

Existe una necesidad de tratamientos contra la T2DM capaces de proporcionar un control eficaz de la glucosa para una porción más grande de los pacientes que necesitan dicho tratamiento. Existe una necesidad adicional de tratamientos contra la T2DM capaces de proporcionar un control eficaz de la glucosa y con un perfil de efectos secundarios favorable. Existe una necesidad de opciones de tratamiento alternativas para proporcionar una pérdida de peso terapéutica en un paciente que necesita dicho tratamiento, tal como un paciente con obesidad grave. Existe un deseo de opciones de tratamiento para la diabetes que se puedan combinar con tratamiento

con insulina y/o tratamiento con incretina para proporcionarle al paciente resultados glucémicos superiores y/o perfiles de efectos secundarios más deseables.

Los compuestos con una duración de acción prolongada en el receptor de GIP son deseables para permitir una dosis menos frecuente del compuesto.

Por consiguiente, la forma de realización 1 es un compuesto de la Fórmula I

Z1X1X2EGTX6ISDYSIX13LDX16X17X18QX20X21X22VX24X25X26L
X28X29GPSSGAPPPSZ2 (SEQ ID NO:4) en donde:

Z1 es una modificación del grupo amino del terminal N en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste en acetilo y ausente;

X1 se selecciona del grupo que consiste en Y y D-Tyr;

X2 se selecciona del grupo que consiste en Aib, A y D-Ala;

X6 se selecciona del grupo que consiste en F, α MeF, Iva, L, α MeL y α MeF(2F);

X13 se selecciona del grupo que consiste en α MeL, A, L y Aib;

X16 se selecciona del grupo que consiste en K, E y Orn;

X17 se selecciona del grupo que consiste en I y K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H;

X18 se selecciona del grupo que consiste en H, A y R;

X20 se selecciona del grupo que consiste en Aib y Q;

X21 se selecciona del grupo que consiste en D y E;

X22 se selecciona del grupo que consiste en F y α MeF;

X24 se selecciona del grupo que consiste en E, N, Q y D-Glu;

X25 se selecciona del grupo que consiste en Y, 4-Pal, W y α MeY;

X26 se selecciona del grupo que consiste en L y K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H;

X28 se selecciona del grupo que consiste en E y A;

X29 se selecciona del grupo que consiste en G, A, Q y T; q se selecciona del grupo que consiste en 16 y 18; y

Z2 está ausente o es una modificación del grupo del terminal C, en donde la modificación es amidación;

en donde uno y solo uno seleccionado de X17 y X26 es $K(2-[2-(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_q\text{-CO}_2\text{H}$;

o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos.

Una forma de realización 2 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de la forma de realización 1 en donde Z1 está ausente y X1 es Y.

Una forma de realización 3 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de la forma de realización 1 o la forma de realización 2 en donde X2 es Aib.

Una forma de realización 4 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 3 en donde:

X6 se selecciona del grupo que consiste en F y $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$.

Una forma de realización 5 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 4 en donde:

X13 se selecciona del grupo que consiste en L y αMeL .

Una forma de realización 6 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 5 en donde X16 es K u Orn.

Una forma de realización 7 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 6 en donde X16 es K.

Una forma de realización 8 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 7 en donde X18 es H.

Una forma de realización 9 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 8 en donde X20 es Aib; y X22 es F.

Una forma de realización 10 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, como se reivindica en cualquiera de las formas de realización 1 a 9 en donde X21 es D.

Una forma de realización 11 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 10 en donde X25 es 4-Pal o Y.

Una forma de realización 12 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 11 en donde:

X17 es $K(2-[2-(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_q\text{-CO}_2\text{H}$; y

X26 es L.

Una forma de realización 13 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 11 en donde:

X17 es I; y

X26 es $K(2-[2-(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_q\text{-CO}_2\text{H}$.

Una forma de realización 14 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 13 en donde q es 16.

Una forma de realización 15 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 13 en donde q es 18.

Una forma de realización 16 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde: Z1 está ausente;

X1 es Y;

X2 se selecciona del grupo que consiste en Aib y D-Ala; X6 es F;

X13 se selecciona del grupo que consiste en α MeL y L;

X16 se selecciona del grupo que consiste en K y Orn;

X18 se selecciona del grupo que consiste en H y A;

X20 es Aib;

X22 es F;

X24 se selecciona del grupo que consiste en E, N y D-Glu;

X25 se selecciona del grupo que consiste en Y, 4-Pal y W;

X28 se selecciona del grupo que consiste en E y A;

X29 se selecciona del grupo que consiste en G, A y Q; donde q se selecciona del grupo que consiste en 16 y 18.

Una forma de realización 17 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 16 en donde:

Z1 está ausente;

X2 es Aib;

X13 es α MeL;

X18 es H;

X24 se selecciona del grupo que consiste en E y D-Glu;

X25 se selecciona del grupo que consiste en Y y 4-Pal;

X28 es E;

X29 se selecciona del grupo que consiste en G y A.

Una forma de realización 18 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 17 en donde: X17 es K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H; y X26 es L.

Una forma de realización 19 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 17 en donde: X17 es I; y X26 es K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H.

Una forma de realización 20 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.

Una forma de realización 21 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:5. Una forma de realización 22 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:6. Una forma de realización 23 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto

de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:7. Una forma de realización 24 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:8. Una forma de realización 25 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:9. Una forma de realización 26 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:10. Una forma de realización 27 proporciona un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la forma de realización 1 en donde el compuesto es SEQ ID NO:11.

Una forma de realización proporciona un método para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en diabetes, obesidad y síndrome metabólico, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 27, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. Una forma de realización proporciona un método para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM, obesidad y síndrome metabólico, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. Una forma de realización proporciona un método para proporcionar una pérdida de peso terapéutica que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. Una forma de realización es un método para tratar la T2DM, que comprende

administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 27, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

Una forma de realización proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para su uso en tratamiento. Una forma de realización proporciona un compuesto de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 27, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para su uso en tratamiento para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en diabetes, obesidad y síndrome metabólico. Una forma de realización proporciona un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, para su uso en tratamiento para tratar una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM, obesidad y síndrome metabólico. En una forma de realización, la afección es T2DM. En una forma de realización, la afección es obesidad. En una forma de realización, la afección es diabetes tipo 1 (T1DM). En una forma de realización, la afección es diabetes en un paciente que recibe tratamiento con insulina. En una forma de realización, la afección es síndrome metabólico.

Los compuestos de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos, pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de síntomas o trastornos. Por ejemplo, en ciertas formas de realización se proporciona un método para el tratamiento de la T2DM en un paciente, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En una forma de realización se proporciona un método para el tratamiento de la obesidad en un paciente, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el

punto de vista farmacéutico de este. En una forma de realización, el método es la inducción de la pérdida de peso no terapéutica en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

En ciertas formas de realización, la presente invención proporciona un método para el tratamiento del síndrome metabólico en un paciente, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En una forma de realización, el método es el tratamiento de la diabetes en un paciente que recibe tratamiento con insulina, que comprende administrar a un sujeto que necesite dicho tratamiento una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este. En la presente también se proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en combinaciones simultáneas, separadas y secuenciales con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4, un inhibidor del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT-2), un modulador del factor de diferenciación de crecimiento 15 ("GDF15"), un modulador del péptido tirosina tirosina ("PYY"), una insulina modificada, amilina, un agonista dual del receptor de amilina y calcitonina y un agonista de oxintomodulina ("OXM") en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM, obesidad y síndrome metabólico. En la presente también se proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en combinaciones simultáneas, separadas y secuenciales con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4, un inhibidor

del cotransportador de sodio-glucosa 2 (SGLT-2), un modulador del factor de diferenciación de crecimiento 15 ("GDF15"), un análogo del péptido tirosina tirosina ("PYY"), una insulina modificada, un agonista del receptor de amilina, un agonista dual del receptor de amilina y calcitonina, un análogo de urocortina-2 (UCN-2) modificado, un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), un agonista del receptor de glucagón y un agonista dual del receptor de GLP-1 y glucagón que incluye oxintomodulina y análogos de estos, en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM, obesidad y síndrome metabólico. En una forma de realización, se proporciona un compuesto de la presente invención en una combinación de dosis fija con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4, un inhibidor de SGLT-2, GDF15, PYY, una insulina modificada, amilina, un agonista dual del receptor de amilina y calcitonina y OXM. En una forma de realización, se proporciona un compuesto de la presente invención en una combinación de dosis fija con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4, un inhibidor de SGLT-2, GDF15, un análogo de PYY, una insulina modificada, un agonista del receptor de amilina, un agonista dual del receptor de amilina y calcitonina, un análogo de urocortina-2 (UCN-2) modificado, un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), un agonista del receptor de glucagón y un agonista dual del receptor de GLP-1 y glucagón que incluye OXM y análogos de estos. En una forma de realización, se proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en combinaciones simultáneas, separadas y secuenciales con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4, un inhibidor de SGLT-2, GDF15, PYY, una insulina modificada, amilina, un agonista dual del

receptor de amilina y calcitonina y OXM en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM y obesidad. En una forma de realización, se proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en combinaciones simultáneas, separadas y secuenciales con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4, un inhibidor de SGLT-2, GDF15, un análogo de PYY, una insulina modificada, un agonista del receptor de amilina, un agonista dual del receptor de amilina y calcitonina, un análogo de urocortina-2 (UCN-2) modificado, un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), un agonista del receptor de glucagón y un agonista dual del receptor de GLP-1 y glucagón, que incluye OXM y análogos de estos, en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM y obesidad. En una forma de realización, se proporciona un compuesto de la presente invención para su uso en combinaciones simultáneas, separadas y secuenciales con uno o más agentes seleccionados de metformina, una tiazolidinediona, una sulfonilurea, un inhibidor de la dipeptidil peptidasa 4 y un inhibidor de SGLT-2 en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM y obesidad.

En una forma de realización, se proporciona un método para tratar la diabetes en un paciente que recibe tratamiento con insulina, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la Fórmula I o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este a un paciente que lo necesite. Una forma de realización es el tratamiento a un paciente al que se le administra un tratamiento con insulina para la T1DM. Una forma de realización es el tratamiento a un paciente al que se le administra un tratamiento con insulina para la T2DM. Una forma de realización es una dosis una vez por semana. Una forma de realización es el tratamiento subcutáneo una vez por

semana a un paciente al que se le administra un tratamiento con insulina. Existe una forma de realización en donde el tratamiento con insulina comprende tratamiento con insulina basal. Existe una forma de realización en donde el tratamiento con insulina comprende tratamiento con insulina a la hora de comer. Existe una forma de realización en donde el tratamiento con insulina comprende tratamiento con insulina ultrarrápida. El tratamiento con insulina administrado con infusiones agudas de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, puede mejorar la fluctuación de glucagón en pacientes que se someten a pinzamiento hipoglucémico, lo que mejora la defensa natural del cuerpo contra la hipoglucemia. Un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, se puede dosificar una vez por semana independientemente del tipo de insulina utilizada o las dosis de insulina utilizadas. Una forma de realización es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 27, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, administrado como una cantidad eficaz a un paciente que recibe tratamiento con insulina, independientemente del tipo de insulina utilizada o las dosis de insulina utilizadas. Una forma de realización es un compuesto de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 27, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, dosificado una vez por semana como una cantidad eficaz a un paciente que recibe tratamiento con insulina, independientemente del tipo de insulina utilizada o las dosis de insulina utilizadas. Como se usa en la presente, "tratamiento con insulina" significa el tratamiento de un paciente con diabetes mediante un tratamiento con insulina aprobado. Dicho tratamiento con insulina es conocido por la persona del oficio de nivel medio y/o profesional clínico de la salud. Por ejemplo, el tratamiento con insulina puede comprender el tratamiento con insulina basal. Dicho "tratamiento con

insulina" con insulina basal se puede usar en un régimen de dosis con insulina a la hora de comer y/o insulina ultrarrápida. Como se usa en la presente, "insulina a la hora de comer" significa insulina y/o insulina modificada que se administrará con las comidas, por ejemplo, entre otras, insulina lispro. Como se usa en la presente, "insulina basal" significa insulina modificada con una duración de acción más prolongada, tal como, por ejemplo, entre otras, insulina glargina.

Otra forma de realización proporciona el uso de un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en T2DM, obesidad y síndrome metabólico. Una forma de realización proporciona el uso de un compuesto de acuerdo con cualquiera de las formas de realización 1 a 27, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en diabetes, obesidad y síndrome metabólico. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de la T2DM. En una forma de realización, el medicamento es para el tratamiento de la obesidad. En una forma de realización, el medicamento es para su uso en el tratamiento de diabetes en un paciente que recibe tratamiento con insulina.

Otra forma de realización proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, y al menos uno seleccionado del grupo que consiste en un portador, diluyente y excipiente. En una forma de realización, se proporciona una composición farmacéutica para administración subcutánea.

Como se usa en la presente, el término "tratamiento" o "tratar" incluye restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma, afección o

trastorno.

Por lo general, ciertos compuestos de la presente invención son eficaces en un amplio rango de dosis. Por ejemplo, las dosis para la administración parenteral una vez por semana pueden estar dentro del rango de 0,05 mg a alrededor de 60 mg por persona por semana.

Los compuestos de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos, incluyen novedosas secuencias de aminoácidos que tienen afinidad al receptor de GIP, con la potencia deseada en el receptor. GIP es un péptido de 42 aminoácidos (SEQ ID NO:1), que, al igual que GLP-1, se conoce como una incretina y desempeña una función fisiológica en la homeostasis de la glucosa al estimular la secreción de insulina de las células beta pancreáticas en presencia de glucosa.

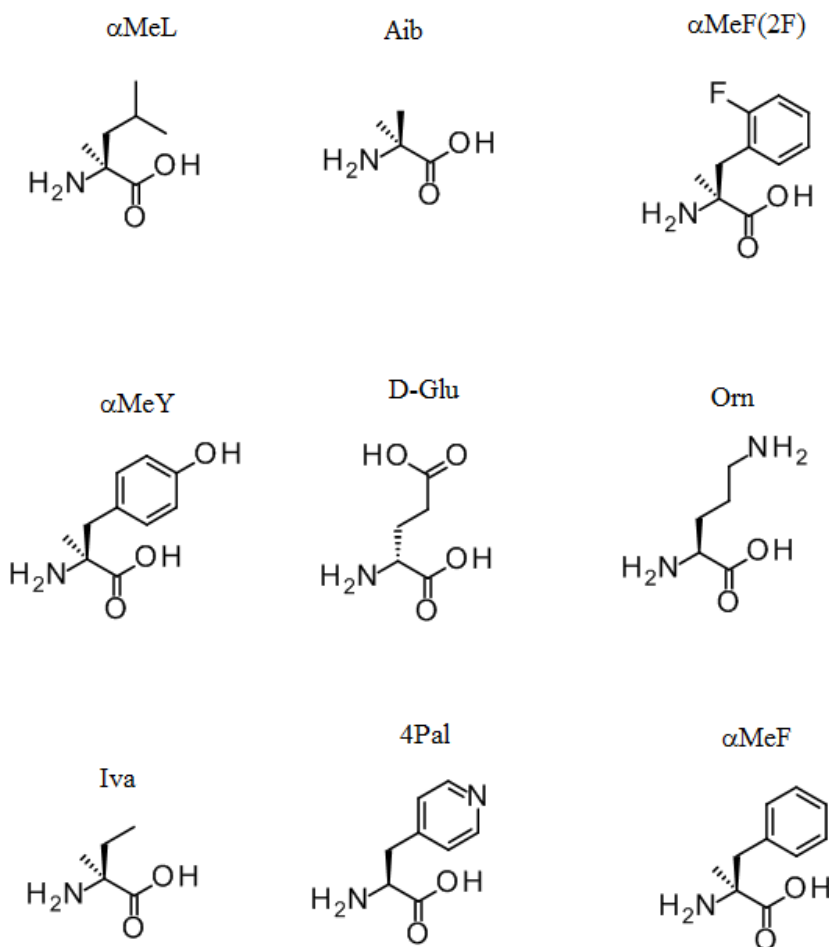
GLP-1 es un péptido de 36 aminoácidos, cuyo principal fragmento biológicamente activo se produce como un péptido amidado del terminal C de 30 aminoácidos (GLP-17-36) (SEQ ID NO:2).

El glucagón es una hormona peptídica de 29 aminoácidos (SEQ ID NO:3) segregada por células α del islote de Langerhans en el páncreas y que está implicada en la homeostasis de la glucosa.

Los compuestos de la presente invención proporcionan la potencia deseada en el receptor de GIP con un alto grado de selectividad contra el GLP-1R y el receptor de glucagón. En una forma de realización, los compuestos tienen actividad deseada del receptor de GIP con una duración de acción prolongada.

Como se usa en la presente, el término "aminoácido" significa tanto aminoácidos naturales como aminoácidos no naturales. Los aminoácidos se representan por lo general mediante el uso de códigos estándar de una letra (por

ejemplo, L = leucina), así como residuos sustituidos con alfa-metilo de aminoácidos naturales (por ejemplo, α -metil leucina, o α MeL, y α -metil fenilalanina, o α MeF), y ciertos otros aminoácidos no naturales, tales como ácido alfa-aminoisobutírico, o "Aib", "4Pal", "Orn" y similares. Las estructuras de estos aminoácidos aparecen a



continuación:

Como se usa en la presente, "Orn" significa L-ornitina. Como se usa en la presente, "4Pal" significa 3-(4-piridil)-L-alanina. Como se usa en la presente, " α MeF(2F)" significa alfa-metil 2-fluoro-L-fenilalanina. Como se usa en la presente, " α MeY" y " α MeL" significan alfa-metil-L-tirosina y alfa-metil-L-leucina, respectivamente. Como se usa en la presente, "e" y "D-Glu" significan ácido D-glutámico. Como se usa en la presente, "D-Tyr" e "y" significan cada uno D-tirosina.

Como se usa en la presente, "D-Ala" y "a" significan cada uno D-alanina. Como se usa en la presente, "αMeF" significa alfa-metil-F y alfa-metil-Phe. Como se usa en la presente, "Iva" significa L-isovalina.

En una forma de realización, la conjugación es una acilación. En una forma de realización, la conjugación es con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de K. En una forma de realización de los compuestos de la presente invención, se conjuga una porción ácido graso, a través de un ligador, con un K en la posición 17. En una forma de realización de los compuestos de la presente invención, se conjuga una porción ácido graso, a través de un ligador, con un K en la posición 26.

En una forma de realización, q se selecciona del grupo que consiste en 16 y 18. En una forma de realización, q es 16. En una forma de realización, q es 18.

Cuando se usa en la presente en referencia al receptor de GIP, las expresiones "actividad", "activa/n", "que activa" y similares se refieren a la capacidad de un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de fijarse a e inducir una respuesta en el receptor, según lo medido mediante ensayos conocidos en la técnica, tales como los ensayos *in vitro* que se describen más adelante.

La afinidad de los compuestos de la Fórmula I, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos, al receptor de GIP puede medirse mediante técnicas conocidas para medir los niveles de fijación al receptor en la técnica, que incluyen, por ejemplo, las descritas en los ejemplos más adelante, y se expresa comúnmente como un valor K_i . La actividad de los compuestos de la presente invención en el receptor de GIP también puede medirse mediante técnicas conocidas en la técnica, que incluyen, por ejemplo, los ensayos de actividad *in vitro* descritos más adelante, y se expresa comúnmente como un valor de EC_{50} , que es la

concentración del compuesto que causa la simulación máxima media en una curva de respuesta a la dosis.

Además, se proporcionan datos para cada compuesto para determinar la actividad y afinidad en los receptores de GLP-1 y glucagón, para demostrar el grado de selectividad de los compuestos de la presente invención para el GIPR.

En una forma de realización, una composición farmacéutica de un compuesto de la Fórmula I es adecuada para la administración por una vía parenteral (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o transdérmica). Algunas composiciones farmacéuticas y los procesos para prepararlas se conocen en la técnica. (Ver, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21.^a edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006)).

Los compuestos de la presente invención pueden reaccionar con cualquiera de una cantidad 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 la metodología común para prepararlas se conocen en la técnica. (Ver, por ejemplo, P. Stahl, *et al.*, Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2.^a edición revisada (Wiley-VCH, 2011)). Las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico de la presente invención incluyen, entre otras, sales de sodio, trifluoroacetato, clorhidrato, amonio y acetato. En una forma de realización, una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en sales de sodio, clorhidrato y acetato.

La presente invención también abarca novedosos intermediarios y procesos útiles para la síntesis de compuestos de la presente invención, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de estos. Los intermediarios y compuestos de la

presente invención pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. En particular, los Ejemplos de más adelante describen un proceso que usa síntesis química. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las vías descritas pueden combinarse de diferentes maneras para preparar los compuestos de la presente invención. Las personas del oficio de nivel medio pueden acceder con facilidad a los reactivos y los materiales de inicio.

Cuando se usa en la presente, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de un compuesto de la presente invención, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, que, tras administrarse al paciente en dosis única o múltiple, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Una persona del oficio de nivel medio puede determinar una cantidad eficaz mediante técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un sujeto, se considera 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 afectación o la gravedad de la enfermedad o el trastorno; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular 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.

Cuando se usa en la presente, la expresión "sujeto que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano, con una enfermedad o afección que requiere tratamiento o terapia, que incluye, por ejemplo, los enumerados en los párrafos anteriores.

Como se usa en la presente, "EDTA" significa ácido etilendiaminotetraacético.

Como se usa en la presente, "DMSO" significa dimetilsulfóxido. Como se usa en la presente, "CPM" significa recuentos por minuto. Como se usa en la presente, "IBMX" significa 3-isobutil-1-metilxantina. Como se usa en la presente, "LC/MS" significa cromatografía de líquidos/espectrometría de masas. Como se usa en la presente, "HTRF" significa fluorescencia homogénea de resolución temporal. Como se usa en la presente, "DMF" se refiere a *N,N*-dimetilformamida. Como se usa en la presente, "DCM" se refiere a diclorometano. Como se usa en la presente, "TFA" se refiere a ácido trifluoroacético. Como se usa en la presente, "sal de TFA" se refiere a sal de trifluoroacetato. Como se usa en la presente, "RP-HPLC" significa cromatografía de líquidos de alta resolución en fase inversa.

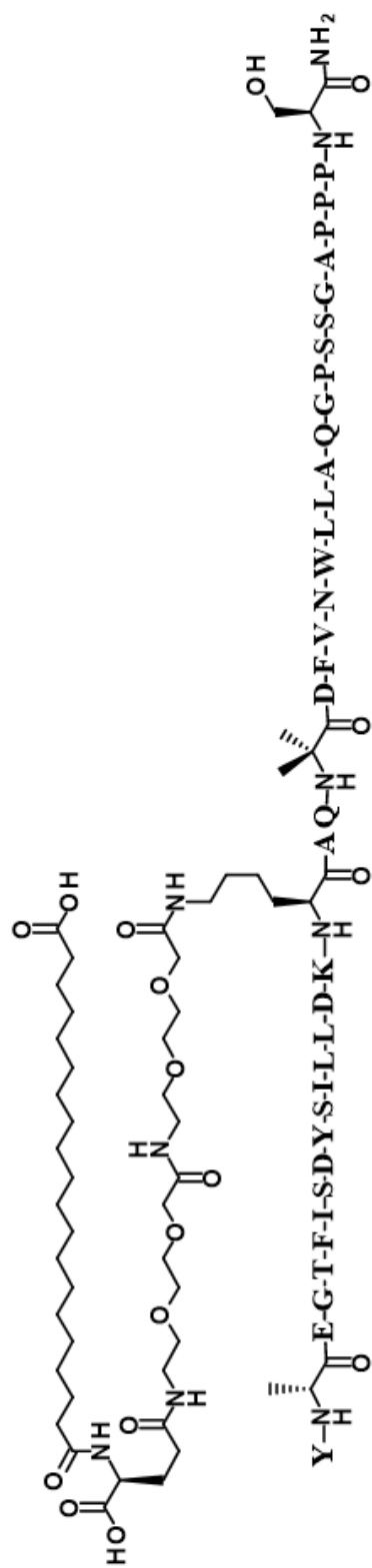
La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos.

SÍNTESIS DE PÉPTIDOS

Ejemplo 1

Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)AQ-Aib-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:5)

La estructura de SEQ ID NO:5 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos D-Ala₂, K₁₇, Aib₂₀ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



La cadena principal del péptido del Ejemplo 1 se sintetiza mediante la química de fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc)/ter-butilo (t-Bu) en un sintetizador de péptidos Symphony multiplex (Gyros Protein Technologies. Tucson, AZ; 3.3.0.1), versión de software 3.3.0.

La resina consiste en aminometil poliestireno funcionalizado con un ligador de amida Rink (poliestireno AM RAM, polímero RAPP GmbH, H40023, malla 200-400) a una sustitución de 0,8 mmol/g. Los grupos protectores de cadena lateral estándar se usan con las siguientes excepciones: Fmoc-Lys(Mtt)-OH, donde Mtt es 4-metiltrilito, se usa para la lisina en la posición 17 y Boc-Tyr(t-Bu)-OH se usa para la tirosina en la posición 1. Los grupos Fmoc se eliminan antes de cada etapa de acoplamiento (2 x 10 minutos) mediante el uso de 20 % de piperidina en DMF. Todos los acoplamientos estándar de aminoácidos se realizan mediante una relación molar igual de aminoácido Fmoc (0,3 M en DMF), diisopropilcarbodiimida (0,9 M en DCM) y oxima (0,9 M en DMF) en un exceso molar de 9 veces sobre la carga teórica del péptido. Los acoplamientos se dejan continuar durante 1,5 horas, con las siguientes excepciones: acoplamiento de valina, 3 horas; acoplamiento de C α -aminoácidos metilados, 6 horas; acoplamiento a CC α -aminoácidos metilados, 6-10 horas. Una vez completada la síntesis de la cadena principal peptídica, la resina se lava exhaustivamente con DCM para eliminar la DMF residual. El grupo protector Mtt en la lisina en la posición 17 se elimina selectivamente de la resina peptídica mediante tres tratamientos de 30 % de hexafluoroisopropanol (Oakwood Chemicals) en DCM (tratamiento de 3 x 20 minutos), y la resina se lava exhaustivamente con DCM y DMF.

La unión posterior de la porción ácido graso-ligador se logra mediante el acoplamiento del ácido 2-[2-(2-Fmoc-amino-etoxi)-etoxi]-acético (Fmoc-AEEA-OH,

ChemPep, Inc.) y éster de α -t-butilo de ácido Fmoc-glutámico (Fmoc-Glu-OtBu, Ark Pharm, Inc.) de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente para reacciones de desprotección y acoplamiento estándar. Después de la eliminación del grupo protector Fmoc final, el ácido mono-OtBu-eicosandioico (WuXi AppTec, Shanghái, China) se acopla durante 1 hora mediante el uso de un exceso de 4 veces del diácido, PyBOP y diisopropiletilamina (1:1:1 mol/mol/mol) en 1:1 de DCM/DMF.

Una vez que se completa la síntesis, la resina peptídica se lava con DCM y luego se seca exhaustivamente al vacío. La resina peptídica seca se trata con un cóctel de escisión (10 ml de TFA, 0,5 ml de triisopropilsilano, 0,5 ml de agua y 0,5 ml de 1,2-etanoditiol) durante 2 horas a temperatura ambiente. La solución de resina peptídica se filtra en un tubo de centrifuga cónico de 50 ml y se trata con un volumen en exceso de 5 veces de dietiléter frío ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) para precipitar el péptido crudo. La suspensión de péptido/éter se centrifuga a 3000 rcf durante 1,5 min para formar un pélet sólido y se decanta el sobrenadante. El pélet se lava dos veces más con dietiléter frío, al centrifugar durante 1 min cada vez, y luego se seca al vacío. El péptido crudo se solubiliza en 20 % de ácido acético/80 % de agua y se purifica mediante RP-HPLC en una columna preparativa C18 SymmetryPrep de 7 μm (18 x 300 mm, Waters) con gradientes lineales de 100 % de acetonitrilo y 0,1 % de TFA/sistema de amortiguador de agua (25-45 % de acetonitrilo en 65 min). La pureza del péptido se evalúa mediante RP-HPLC analítica y los criterios de agrupación son >95 %. La pureza de la agrupación principal del compuesto del Ejemplo 1 resulta ser del 96,8 %. La liofilización posterior de la agrupación de producto principal final produce una sal de TFA de péptido liofilizado. El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}=1638,4$; calculado $[\text{M}+3\text{H}]^{3+}=1638,53$; MW encontrado (promedio) = 4912,2; MW calculado (promedio): 4912,58).

Ejemplo 2

Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H)AQ-Aib-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:6)

La estructura de SEQ ID NO:6 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos D-Ala₂, K₁₇, Aib₂₀ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:

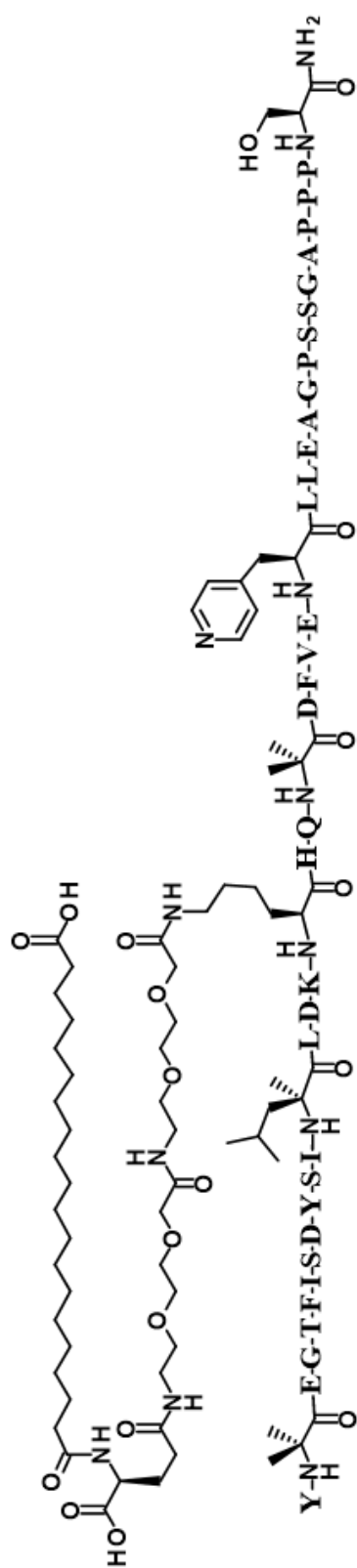


El compuesto de acuerdo con SEQ ID NO:6 se prepara sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1, donde en cambio el diácido protegido es ácido mono-OtBu-octadecanodioico (WuXi AppTec, Shanghai, China). El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[M+3H]^{3+}=1629,15$; calculado: $[M+3H]^{3+}=1629,18$; MW encontrado (promedio) = 4884,45; MW calculado (promedio) = 4884,53).

Ejemplo 3

Y-Aib-EGTFISDYSI- α MeL-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)HQ-Aib-DFVE-4-Pal-LLEAGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:7)

La estructura de SEQ ID NO:7 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos Aib₂, α MeL₁₃, K₁₇, Aib₂₀, 4-Pal₂₅ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:

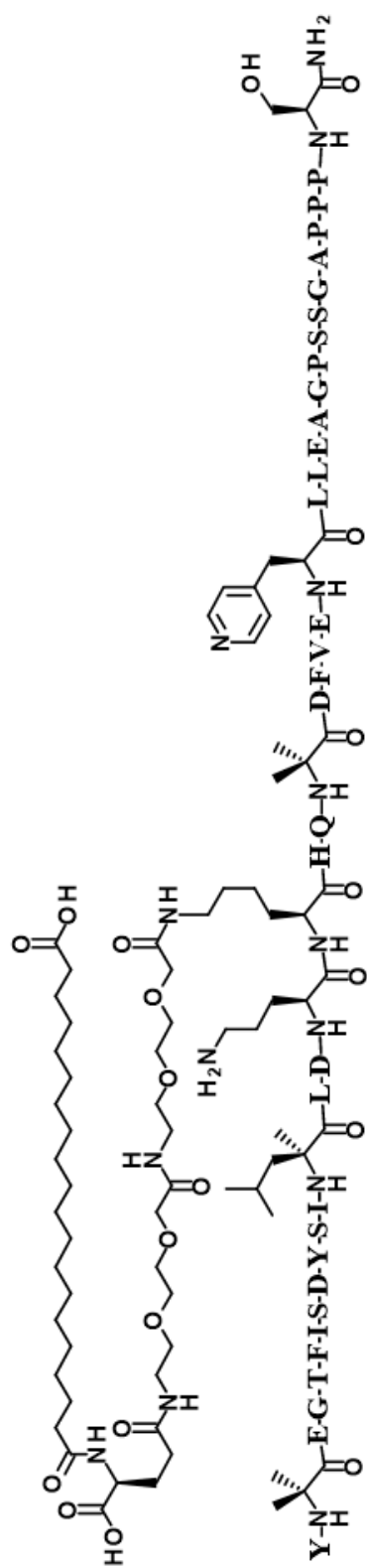


El compuesto de acuerdo con SEQ ID NO:7 se prepara sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1. El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[M+3H]^{3+}=1662,52$; calculado: $[M+3H]^{3+}=1662,55$; MW encontrado (promedio) = 4984,55; MW calculado (promedio) = 4984,64).

Ejemplo 4

Y-Aib-EGTFISDYSI- α MeL-LD-Orn-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)HQ-Aib-DFVE-4-Pal-LLEAGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:8)

La estructura de SEQ ID NO:8 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos Aib₂, α MeL₁₃, Orn₁₆, K₁₇, Aib₂₀, 4-Pal₂₅ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:

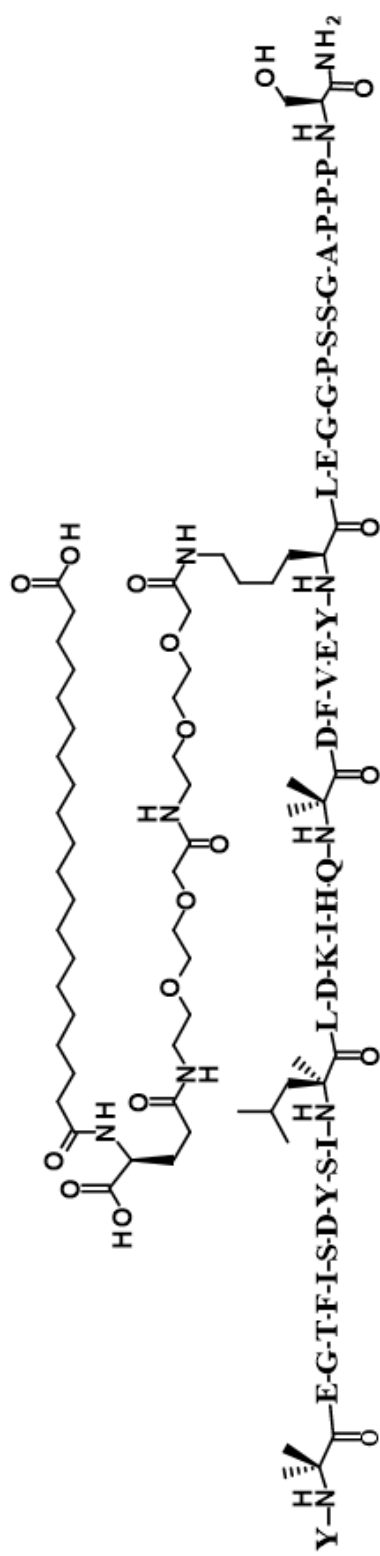


El compuesto de acuerdo con SEQ ID NO:8 se prepara sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1. El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[M+3H]^{3+}=1657,82$; calculado: $[M+3H]^{3+}=1657,87$; MW encontrado (promedio) = 4970,46; MW calculado (promedio) = 4970,62).

Ejemplo 5

Y-Aib-EGTFISDYSI- α MeL-LDKIHQ-Aib-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:9)

La estructura de SEQ ID NO:9 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos Aib₂, α MeL₁₃, Aib₂₀, K₂₆ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:

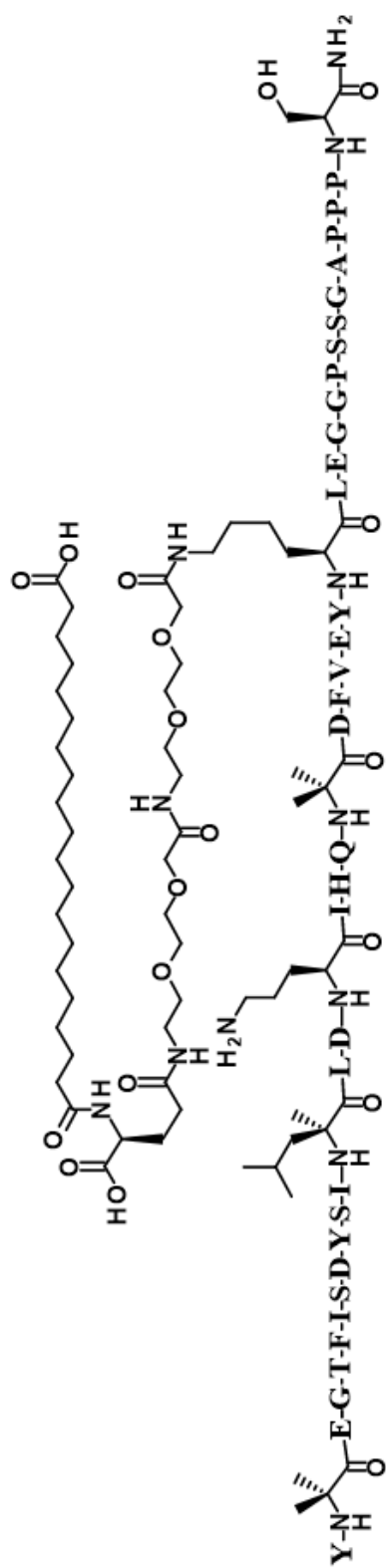


El compuesto de acuerdo con SEQ ID NO:9 se prepara sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1, donde se usa Fmoc-Lys (Mtt)-OH para la lisina en la posición 26 en lugar de en la posición 17. El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[M+3H]^{3+}=1662,8$; calculado: $[M+3H]^{3+}=1662,88$; MW encontrado (promedio) = 4985,4; MW calculado (promedio) = 4985,63).

Ejemplo 6

Y-Aib-EGTFISDYSI- α MeL-LD-Orn-IHQ-Aib-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H)LEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:10)

La estructura de SEQ ID NO:10 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos Aib₂, α MeL₁₃, Orn₁₆, Aib₂₀, K₂₆ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:

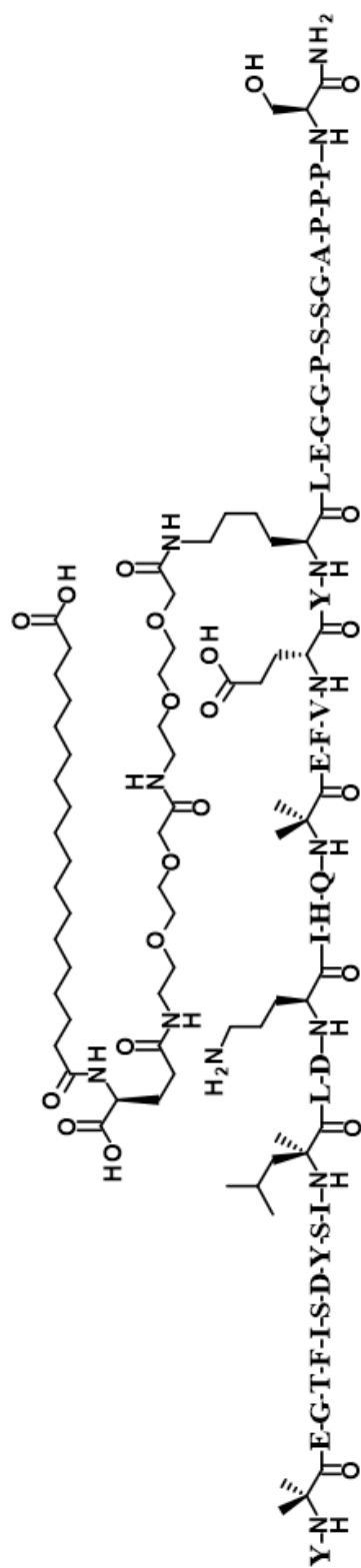


El compuesto de acuerdo con SEQ ID NO:10 se prepara sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1, donde se usa Fmoc-Lys (Mtt)-OH para la lisina en la posición 26 en lugar de en la posición 17. El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[M+3H]^3+=1658,1$; calculado: $[M+3H]^3+=1658,20$; MW encontrado (promedio) = 4971,3; MW calculado (promedio) = 4971,6).

Ejemplo 7

Y-Aib-EGTFISDYSI- α MeL-LD-Orn-IHQ-Aib-EFV-(D-Glu)-YK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H)LEGGPSSGAPPPS-NH₂ (SEQ ID NO:11)

La estructura de SEQ ID NO:11 se representa a continuación mediante el uso de los códigos estándar de aminoácidos de una sola letra con las excepciones de los residuos Aib₂, α MeL₁₃, Orn₁₆, Aib₂₀, D-Glu₂₄, K₂₆ y Ser₃₉, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



El compuesto de acuerdo con SEQ ID NO:11 se prepara sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1, donde se usa Fmoc-Lys (Mtt)-OH para la lisina en la posición 26 en lugar de en la posición 17 y el diácido protegido es ácido mono-OtBu-octadecanodioico (WuXi AppTec, Shanghai, China). El peso molecular se determina mediante LC/MS (encontrado: $[M+3H]^3+=1653,4$; calculado: $[M+3H]^3+=1653,52$; MW encontrado (promedio) = 4957,2; MW calculado (promedio) = 4957,57).

Los compuestos de acuerdo con el Ejemplo 8 (SEQ ID NO:12) hasta el Ejemplo 122 (SEQ ID NO:126) se preparan sustancialmente como se describe mediante los procedimientos del Ejemplo 1.

Ejemplo	SEQ ID NO	Nombre del compuesto	MW calculado (promedio)	MW encontrado (promedio)
8	12	Y-(Aib)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4926,61	4926,6

9	13	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4978,64	4978,4
10	14	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQQDFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4950,59	4950,4
11	15	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)AQQDFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4955,61	4955,2
12	16	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)AQQDFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4884,53	4884,4

13	17	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQQEFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	5035,7	5035,2
14	18	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQQDFVEWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	5036,68	5036,8
15	19	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQQDFVNYLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4998,63	4998,4
16	20	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-DFVEWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4899,54	4899,3

17	21	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-DFVNWLLEQGPSSGAPPPS-NH ₂	4942,56	4941,9
18	22	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-DFVN-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4846,48	4846,5
19	23	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-DFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4813,45	4813,2
20	24	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-EFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4898,55	4898,4
21	25	Y-(Aib)-EGTFISDYSIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4828,42	4827,9

22	26	Y-(Aib)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4870,5	4870,5
23	27	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4842,45	4842,3
24	28	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(Aib)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4842,45	4842,3
25	29	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4907,56	4907,1

26	30	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4925,56	4925,4
27	31	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-EFVQWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4841,5	4841,4
28	32	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-EFVNWLLLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4885,51	4885,2
29	33	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)AQ-(Aib)-EFVEWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4842,49	4842,45

30	34	acetil-(D-Tyr)-AEGT- α MeF(2F)- ISDYSIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)- etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂)16- CO ₂ H)HQ-(Aib)- EFVNYLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4902,47	4902,0
31	35	Y-(Aib)-EGTFISDYSILLDKK((2-[2-(2- amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO- (CH ₂)16-CO ₂ H)HQ-(Aib)- DFVNYLLAAGPSSGAPPPS-NH ₂	4884,53	4884,6
32	36	Y-(D-Ala)-EGTLISDYSILLDKK((2-[2-(2- amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO- (CH ₂)16-CO ₂ H)AQ-(Aib)- DFVNWLLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4850,51	4850,4
33	37	acetil-(D-Tyr)-AEGT- α MeF(2F)- ISDYSIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)- etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂)18- CO ₂ H)HQ-(Aib)- EFVNYLLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4988,56	4988,1

34	38	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVNYLLATGPSSGAPPPS-NH ₂	4946,57	4946,4
35	39	Y-(Aib)-EGT-(α MeL)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVNYLLATGPSSGAPPPS-NH ₂	4894,56	4894,2
36	40	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5005,59	5005,8

37	41	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4961,54	4961,4
38	42	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH ₂	4990,58	4990,2
39	43	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSLDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4946,53	4946,4

40	44	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEWLLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5028,63	5028,6
41	45	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH ₂	4972,59	4972,5
42	46	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEQGPSSGAPPPS-NH ₂	4999,61	4999,8
43	47	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4942,56	4942,2

44	48	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYSIALDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4928,54	4928,1
45	49	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5014,67	5014,65
46	50	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5041,69	5041,35
47	51	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4970,62	4970,4

48	52	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4912,58	4912,8
49	53	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4884,51	4884,6
50	54	Y-(Aib)-EGT-(αMeF)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4926,61	4926,9
51	55	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4944,6	4944,6

52	56	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4926,61	4926,3
53	57	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4927,59	4927,5
54	58	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEWLLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4950,63	4950,6
55	59	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4864,54	4864,8

56	60	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-D-(α MeF)-VE-(4-Pal)-LLAGPSSGAPPPS-NH ₂	4926,61	4926,6
57	61	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4997,69	4997,5
58	62	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH ₂	4970,66	4970,4
59	63	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH ₂	4940,63	4940,4

60	64	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYSI-(α MeL)- LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS- NH ₂	5011,71	5011,5
61	65	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYSI-(α MeL)- LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS- NH ₂	4984,69	4984,8
62	66	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYSI-(α MeL)- LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-EFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS- NH ₂	4954,66	4954,2
63	67	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2- [2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ - Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)- EFVEYLLEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5070,73	5070,9

64	68	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5043,71	5043,9
65	69	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVEYLLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	5013,68	5013,9
66	70	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5029,68	5029,2
67	71	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5056,71	5056,8
68	72	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4999,65	4999,2

69	73	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEYLLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4985,63	4985,7
70	74	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH ₂	4956,63	4956,3
71	75	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVEWLLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5052,72	5052,6
72	76	Y-(Aib)-EGTLISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVEYLLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5009,69	5009,7
73	77	Y-(Aib)-EGTLISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-EFVEYLLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4965,64	4965,3

74	78	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)- LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS- NH ₂	4922,57	4922,4
75	79	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)- LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS- NH ₂	4966,63	4966,8
76	80	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LD- (Orn)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS- NH ₂	4908,55	4908,6
77	81	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LD- (Orn)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ- (Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS- NH ₂	4952,6	4952,4

78	82	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH ₂	4926,61	4926,3
79	83	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4983,66	4983,3
80	84	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLETGPSSGAPPPS-NH ₂	5000,64	5000,4
81	85	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5027,67	5027,7

82	86	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4956,59	4956,45
83	87	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDEK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLATGPSSGAPPPS-NH ₂	4957,57	4957,8
84	88	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDEK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4984,6	4984,2
85	89	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDEK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAAGPSSGAPPPS-NH ₂	4927,55	4927,2

86	90	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDEK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4913,52	4913,1
87	91	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4942,56	4942,8
88	92	Y-(Aib)-EGT-(Iva)-ISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4936,6	4936,2
89	93	Y-(Aib)-EGTLISDYSI-(αMeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-LLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4950,63	4950,6

90	94	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(α MeY)-LLEAGPSSGAPPPS-NH ₂	5013,64	5013,6
91	95	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)HQ-(Aib)-DFVE-(α MeY)-LLEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4999,61	4999,5
92	96	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5056,71	5057,1
93	97	Y-(D-Ala)-EGTFISDYSILLDKIAQ-(Aib)-DFVNWK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)LAQGPSSGAPPPS-NH ₂	4884,53	4884,3

94	98	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)LAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4874,46	4874,4
95	99	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4960,55	4960,8
96	100	Y-(Aib)-EGTFISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4870,5	4870,2
97	101	Y-(Aib)-EGT-(α MeF)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4884,53	4884,6

98	102	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-EFVNYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LAGGPSSGAPPPS-NH ₂	4902,52	4902,15
99	103	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4961,54	4961,4
100	104	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKIHQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4984,64	4984,2
101	105	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFV-(D-Glu)-YK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4971,6	4971,75

102	106	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFV-(D-Glu)-YK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4985,63	4985,1
103	107	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4943,55	4943,4
104	108	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4999,65	4999,2
105	109	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LETGPSSGAPPPS-NH ₂	5029,68	5029,2

106	110	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5056,71	5056,8
107	111	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4985,63	4985,4
108	112	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4956,59	4956,3
109	113	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4970,62	4970,4

110	114	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4942,56	4942,2
111	115	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₆ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4928,54	4928,4
112	116	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4946,53	4946,4
113	117	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)-ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxy)-etoxy]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4960,55	4960,8

114	118	Y-(Aib)-EGT- α MeF(2F)- ISDYSIALDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)- K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]- acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂)18- CO ₂ H)LEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5017,6	5017,2
115	119	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKIRQ- (Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)- etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂)18- CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	5004,63	5004,6
116	120	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LD-(Orn)- IRQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino- etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO- (CH ₂)18-CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS- NH ₂	4990,61	4990,2
117	121	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LDKIHQ- (Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)- etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂)18- CO ₂ H)LEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4999,65	4999,8

118	122	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(αMeL)-LDKIRQ-(Aib)-DFVEYK((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEAGPSSGAPPPS-NH ₂	5018,66	5018,4
119	123	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSILLDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEGGPSSGAPPPS-NH ₂	4988,57	4988,4
120	124	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSILLDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEAGPSSGAPPPS-NH ₂	5002,59	5002,5
121	125	Y-(Aib)-EGT-αMeF(2F)-ISDYSILLDKIHQ-(Aib)-DFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEQGPSSGAPPPS-NH ₂	5059,64	5059,8

122	126	Y-(Aib)-EGTFISDYSI-(α MeL)-LD-(Orn)-IHQ-(Aib)-EFVE-(4-Pal)-K((2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH ₂) ₁₈ -CO ₂ H)LEAGPSSGAPPPS-NH ₂	4984,64	4984,80
-----	-----	--	---------	---------

Ensayos de fijación

El glucagón (denominado Gcg o hGcg) es un estándar de referencia preparado en Eli Lilly and Company. GLP-1(7-36)-NH₂ (denominado GLP-1 o hGLP-1) se obtiene de CPC Scientific (Sunnyvale, CA, 97,2 % de pureza, alícuotas 100 μ M en 100 % de DMSO). GIP(1-42)-NH₂ (denominado GIP) se prepara en Lilly Research Laboratories mediante el uso de la síntesis de péptidos y la cromatografía HPLC como se describió anteriormente (>80 % de pureza, alícuotas 100 μ M en 100 % de DMSO). Se prepara Gcg, GLP-1 o GIP radioetiquetado con [125I] mediante el uso de [125I]-lactoperoxidasa y se obtiene de Perkin Elmer (Boston, MA).

Se preparan líneas celulares transfectadas de manera estable al subclonar el cADN del receptor en un plásmido de expresión pcADN3 y se transfectan en células de riñón embrionario humano (HEK) 293 (hGcgR y hGLP-1R) u ovario de hámster chino (CHO) (hGIPR) seguido de selección con geneticina (hGLP-1R y hGIPR) o higromicina B (hGcgR).

Se usan dos métodos para la preparación de membranas celulares crudas.

Método 1: los pélets celulares congelados se lisan en hielo en un amortiguador hipotónico que contiene Tris HCl 50 mM, pH 7,5, e inhibidores de la

proteasa Roche Complete™ con EDTA. La suspensión celular se altera mediante el uso de un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio equipado con un pistilo de Teflon® para 25 golpes. El homogeneizado se centrifuga a 4 °C a 1100 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se recolecta y se almacena en hielo mientras los pélets se vuelven a suspender en amortiguador de homogeneización y se vuelven a homogeneizar como se describió anteriormente. El homogeneizado se centrifuga a 1100 x g durante 10 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante y se centrifuga a 35000 x g durante 1 hora a 4 °C. El pélet de membrana resultante se vuelve a suspender en amortiguador de homogeneización que contiene inhibidores de la proteasa a aproximadamente 1 a 3 mg/ml, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se almacena como alícuotas en un congelador a -80 °C hasta su uso.

Método 2: los pélets celulares congelados se lisan en hielo en un amortiguador hipotónico que contiene Tris HCl 50 mM, pH 7,5, MgCl₂ 1 mM, inhibidores de la proteasa libres de EDTA Roche Complete™ y 25 unidades/ml de ADNasa I (Invitrogen). La suspensión celular se altera mediante el uso de un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio equipado con un pistilo de Teflon® para 20 a 25 golpes. El homogeneizado se centrifuga a 4 °C a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante se recolecta y se almacena en hielo mientras los pélets se vuelven a suspender en amortiguador de homogeneización (sin ADNasa I) y se vuelven a homogeneizar como se describió anteriormente. El homogeneizado se centrifuga a 1800 x g durante 15 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante y se centrifuga un tiempo adicional a 1800 x g durante 15 minutos. El sobrenadante total se centrifuga luego a 25000 x g durante 30 minutos a 4 °C. El pélet de membrana resultante se vuelve a suspender en

amortiguador de homogeneización (sin ADNasa I) que contiene inhibidores de la proteasa a aproximadamente 1 a 3 mg/ml y se almacena como alícuotas en un congelador a -80 °C hasta su uso.

Métodos de determinación de fijación

Las constantes de disociación (K_d) de fijación en equilibrio para las diversas interacciones receptor/radioligando se determinan a partir del análisis de fijación de competencia homóloga en lugar de fijación de saturación debido al alto contenido de propanol en el material de reserva de [125I]. Los valores de K_d determinados para las preparaciones de receptores fueron los siguientes: hGcgR (3,9 nM), hGLP-1R (1,2 nM) y hGIPR (0,14 nM).

Fijación a [125I]-glucagón

Los ensayos de fijación al receptor de Gcg humano se realizan mediante el uso de un formato de ensayo de proximidad de centelleo (SPA) con microesferas de aglutinina de germen de trigo (WGA) (Perkin Elmer). El amortiguador de fijación contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazintansulfónico (HEPES) 25 mM, pH 7,4, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,1 % (p/v) de bacitracina (Research Products), 0,003 % (p/v) de monolaurato de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20) e inhibidores de la proteasa Roche Complete™ sin EDTA. Los péptidos y Gcg se descongelan y se diluyen 3 veces en serie en 100 % de DMSO (curvas de concentración-respuesta de 10 puntos). A continuación, se transfieren 5 µl de compuesto diluido en serie o DMSO a 3632 placas de ensayo de fondo transparente Corning® que contienen 45 µl de amortiguador de fijación de ensayo o control de Gcg sin etiquetar (fijación no específica o NSB, a 1 µM final). Luego, se agregan 50 µl de [125I]-Gcg (0,15 nM final), 50 µl de membranas de GcgR humano (1,5 µg/cavidad) y 50 µl de

microesferas de SPA con WGA (de 80 a 150 µg/cavidad) con un dispensador Biotek Multiflo. Las placas se sellan y se mezclan en un agitador de placas (configuración 6) durante 1 minuto y se leen con un contador de centelleo PerkinElmer Trilux MicroBeta® después de 12 horas de incubación/tiempo de sedimentación a temperatura ambiente. Los rangos finales de concentración de ensayo para los péptidos evaluados en curvas de respuesta son por lo general de 1150 nM a 0,058 nM y para el Gcg de control, de 1000 nM a 0,05 nM.

Fijación a [125I]-GLP-1

El ensayo de fijación al receptor de GLP-1 humano se realiza mediante el uso de un formato de SPA con microesferas de WGA. El amortiguador de fijación contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,1 % (p/v) de bacitracina, 0,003 % (p/v) de TWEEN®-20 e inhibidores de la proteasa Roche Complete™ sin EDTA. Los péptidos y GLP-1 se descongelan y se diluyen 3 veces en serie en 100 % de DMSO (curvas de concentración-respuesta de 10 puntos). A continuación, se transfieren 5 µl de compuesto diluido en serie o DMSO a 3632 placas de ensayo de fondo transparente Corning® que contienen 45 µl de amortiguador de fijación de ensayo o control de GLP-1 sin etiquetar (fijación no específica o NSB, a 0,25 µM final). Luego, se agregan 50 µl de [125I]-GLP-1 (0,15 nM final), 50 µl de membranas de GLP-1R humano (0,5 µg/cavidad) y 50 µl de microesferas de SPA con WGA (de 100 a 150 µg/cavidad) con un dispensador Biotek Multiflo. Las placas se sellan y se mezclan en un agitador de placas (configuración 6) durante 1 minuto y se leen con un contador de centelleo PerkinElmer Trilux MicroBeta® después de 5 a 12 horas de incubación/tiempo de sedimentación a temperatura ambiente. Los rangos finales de concentración de ensayo para los péptidos evaluados en curvas de respuesta son por lo general de

1150 nM a 0,058 nM y para el GLP-1 de control, de 250 nM a 0,013 nM.

Fijación a [¹²⁵I]-GIP

El ensayo de fijación al receptor de GIP humano se realiza mediante el uso de un formato de SPA con microesferas de WGA. El amortiguador de fijación contiene HEPES 25 mM, pH 7,4, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, 0,1 % (p/v) de bacitracina, 0,003 % (p/v) de TWEEN®-20 e inhibidores de la proteasa Roche Complete™ sin EDTA. Los péptidos y GIP se descongelan y se diluyen 3 veces en serie en 100 % de DMSO (curvas de concentración-respuesta de 10 puntos). A continuación, se transfieren 5 µl de compuesto diluido en serie o DMSO a 3632 placas de ensayo de fondo transparente Corning® que contienen 45 µl de amortiguador de fijación de ensayo o control de GIP sin etiquetar (fijación no específica o NSB, a 0,25 µM final). Luego, se agregan 50 µl de [¹²⁵I]-GIP (0,075-0,15 nM final), 50 µl de membranas de GIPR humano (3 µg/cavidad) y 50 µl de microesferas de SPA con WGA (de 100 a 150 µg/cavidad) con un dispensador Biotek Multiflo. Las placas se sellan y se mezclan en un agitador de placas (configuración 6) durante 1 minuto y se leen con un contador de centelleo PerkinElmer Trilux MicroBeta® después de 2,5 a 12 horas de incubación/tiempo de sedimentación a temperatura ambiente. Los rangos finales de concentración de ensayo para los péptidos evaluados en curvas de respuesta son por lo general de 1150 nM a 0,058 nM o de 115 nM a 0,0058 nM y para el GIP de control, de 250 nM a 0,013 nM.

Análisis de datos de ensayo de fijación

Los datos de CPM sin procesar para las curvas de concentración de péptidos, Gcg, GLP-1 o GIP se convierten en porcentaje de inhibición al restar la fijación no específica (fijación en presencia de un exceso de Gcg, GLP-1 o GIP sin

etiquetar, respectivamente) a partir de los valores individuales de CPM y al dividir por la señal de fijación total, también corregida al restar la fijación no específica. Los datos se analizan mediante el uso de rutinas de regresión no lineal de cuatro parámetros (máximo de la curva, mínimo de la curva, IC50, pendiente de Hill) (Genedata Screener, versión 12.0.4, Genedata AG, Basal, Suiza). La constante de afinidad (K_i) se calcula a partir del valor de IC50 absoluto valor en función de la ecuación $K_i = IC50/(1 + D/K_d)$ donde D es la concentración de radioligando utilizada en el experimento, IC50 es la concentración que causa 50 % de inhibición de la fijación y K_d es la constante de disociación de fijación en equilibrio del radioligando (descrita anteriormente). Los valores de K_i se informan como la media geométrica, con el error expresado como el error estándar de la media (SEM), y n es igual a la cantidad de réplicas independientes (determinadas en los análisis realizados en días diferentes). Las medias geométricas se calculan de la siguiente manera:

$$\text{Media geométrica} = 10(\text{Media aritmética de los valores log de } K_i)$$

$n=y/x$ significa que solo se usa un subconjunto de réplicas (y) de la cantidad total de réplicas (x) para expresar la media. SEM solo se calcula cuando $y = 2$ o más. Las medias se expresan como medias geométricas con el error estándar de la media (SEM) y la cantidad de réplicas (n) indicada entre paréntesis.

Tabla 1. Afinidad de fijación *in vitro* (K_i) de los Ejemplos indicados y las moléculas de comparación para GcgR, GIPR y GLP-1R humanos en presencia de 0,1 % de bacitracina.

Ejemplo o comparador	hGcgR Ki (nM) (SEM, n)	hGIPR Ki (nM) (SEM, n)	hGLP1R Ki (nM) (SEM, n)
hGIP-NH ₂	1150 (18,3, n=4)	0,125 (0,00511, n=319)	1100 (143, n=4)
hGlucagón	3,05 (0,120, n=457)	>2420 (n=3)	>4940 (n=5)
hGLP-1 (7-36) NH ₂	>4590 (n=5)	>2300 (n=3)	0,785 (0,0252, n=489)
1	228 (46,6, n=5)	0,0667 (0,0566, n=5)	57,8 (16,7, n=5)
2	379 (218, n=3)	0,0373 (0,000430, n=3)	77,9 (20,2, n=3)
3	338 (220, n=8)	0,0525 (0,0215, n=8)	381 (226, n=8)
4	431 (253, n=6)	0,0620 (0,0259, n=6)	423 (235, n=6)
5	619 (140, n=9)	0,0771 (0,0342, n=9)	>913 (n=9)
6	453 (125, n=7)	0,104 (0,0866, n=7)	571 (368, n=7)
7	>961 (n=5)	0,193 (0,157, n=5)	>913 (n=5)
8	101	0,027	38,1
9	>230	0,110	168

10	>230	0,159	60,7
11	163	0,0584	85,9
12	134	0,0876	46,8
13	>230	0,237	>213
14	>230	0,460	>213
15	>254	0,471	>236
16	549	0,0438	99,2
17	274	0,0571	106
18	463	0,0331	158
19	335	0,0469	15,2
20	216	0,0477	79,8
21	>1530	1,46	801
22	>1380	0,219	388
23	323	0,0341	251
24	>960	0,254	729
25	101	0,0417	15,8
26	74,1	0,045	16,5
27	401	0,0354	23,2
28	86,8	0,0732	6,46
29	133	0,0569	22,7
30	407	0,037	26,5
31	>959	0,0473	266
32	>959	0,0343	85,2
33	63,5	0,0369	31,2

34	143	0,034	201
35	>960	0,0351	177
36	201	0,0683	393
37	51,4	0,026	83,9
38	182 (59,8, n=2)	0,0588 (0,0112, n=2)	776 (134, n=2)
39	76,0 (19,3, n=2)	0,0444 (0,00439, n=2)	235 (8,34, n=2)
40	50,9	0,0594	302
41	758	0,143	>906
42	99,1	0,0392	563
43	285 (121, n=2)	0,0366	605
44	50	0,059	209
45	660 (257, n=3)	0,0663 (0,0241, n=3)	>909 (n=3)
46	435 (89,6, n=3)	0,0319 (0,00724, n=3)	744. (58,2, n=3)
47	175 (69,7, n=3)	0,0452 (0,0127, n=3)	320 (77,8, n=3)
48	267	0,0498	211
49	>960	0,0512	596
50	23,4	0,0501	34,9
51	26,7	0,0386	54,1
52	114	0,0372	128

53	152	0,0184	62,9
54	386	0,0326	49,9
55	>960	0,0331	262
56	193	0,0487	530
57	422	0,0154	280
58	418 (1,17, n=2)	0,0324 (0,00694, n=2)	459 (68,3, n=2)
59	230	0,0148	109
60	26,2	0,0390	51,4
61	80,4	0,0665	135
62	31,3	0,0414	47,6
63	185	0,0248	327
64	196	0,022	477
65	279	0,0316	305
66	279	0,0866	326
68	290	0,0948	421
69	114	0,0406	144
70	857	0,0421	570
71	102	0,0422	347
72	837	0,0594	437
73	292	0,036	117
74	511	0,0287	395
75	>958	0,0626	>902
76	358	0,0293	263

77	>958 (n=2)	0,0841 (0,0207, n=2)	>905 (n=2)
78	505	0,0236	394
79	888	0,0229	486
80	>958 (n=2)	0,0828 (0,0284, n=2)	>906 (n=2)
81	699 (35,4, n=2)	0,0374 (0,0106, n=2)	714 (39,8, n=2)
82	305 (112, n=2)	0,0617 (0,00946, n=2)	388 (140, n=2)
83	>958	0,116	452
84	>958	0,0584	325
85	800	0,0529	220
86	462	0,0533	108
87	576	0,0538	849
88	788	0,0830	261
89	611 (n=3)	0,0720 (0,0169, n=4)	294 (72,9, n=4)
90	112	0,129	102
91	54,4	0,122	37,4
92	>958	0,0331	>902
93	>959	0,0430	>909
94	114	0,0310	>909
95	85,0	0,0255	832
96	>960	0,232	>908

97	77,5	0,0249	570
98	38,4	0,0195	311
99	174	0,0341	>901
100	572 (182, n=4)	0,0674 (0,0265, n=3)	>913 (n=3)
101	>961 (n=2)	0,139 (0,0585, n=2)	>913 (n=2)
102	>961 (n=3)	0,164 (0,113, n=3)	>913 (n=3)
103	>960	0,0405	>913
104	>960	0,134	>910
105	>960	0,174	>910
106	304	0,0918	>910
107	347	0,0722	>911
108	>960	0,134	>910
109	>960	0,117	>908
110	>960	0,339	>908
111	>960	0,0871	>908
112	257	0,0742	>908
113	821 (3,12, n=4)	0,108 (0,0287, n=5)	>921 (n=5)
114	>971 (n=3)	0,121 (0,0496, n=4)	>921 (n=4)
115	373 (n=2)	0,0997 (0,0472, n=2)	>912 (n=2)

116	178 (n=2)	0,166 (0,0753, n=2)	>912 (n=2)
117	685	0,0722	591
118	NA	0,0696	>920
119	68,8 (n=2)	0,129 (0,0552, n=2)	723 (119, n=2)
120	575 (n=2)	0,171 (0,231, n=2)	>912 (n=2)
121	94,9 (n=2)	0,103 (0,0473, n=2)	>912 (n=2)
122	957	0,0311	>913

Como se demuestra en la Tabla 1, los ejemplos de la presente invención son aglutinantes muy potentes del GIPR humano y tienen menor afinidad al GLP-1R y GcgR.

Ensayo funcional farmacológico de cAMP en presencia de 0,1 % de caseína

Un conjunto de ensayos de cAMP se lleva a cabo en células HEK293 que expresan el receptor de GLP-1 (GLP-1R) humano, el receptor de péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (GIPR) y el receptor de glucagón humanos (GcgR). Cada línea celular que sobreexpresa el receptor (20 µl) se trata con el péptido de prueba en DMEM (N.º de catálogo Gibco 31053) complementado con 0,1 % de caseína (N.º de catálogo Sigma C4765), IBMX 250 µM, 1X GlutaMAX™ (N.º de catálogo Gibco 35050) y HEPES 20 mM (N.º de catálogo HyClone SH30237.01)

en un volumen de ensayo de 20 μ l. Después incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente, el aumento resultante en cAMP intracelular se determina cuantitativamente mediante el uso del kit de ensayo CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (62AM4PEJ). Luego, se agregan el amortiguador de lisis que contiene el conjugado cAMP-d2 (20 μ l) y el anticuerpo anti-cAMP-Eu3+-criptato (20 μ l) para determinar el nivel de cAMP. Después incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente, la señal de HTRF se detecta con un lector de placas Envision 2104 (PerkinElmer). Se mide la emisión fluorescente a 620 nm y a 665 nm y se calcula la relación entre 620 nm y a 665 nm y después se convierte a cAMP nM por cavidad mediante el uso de una curva estándar de cAMP. Las curvas de respuesta a la dosis de los compuestos se representan como el porcentaje de estimulación normalizado 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. Un valor de EC50 relativo se deriva por análisis de regresión no lineal mediante el porcentaje de respuesta máxima en comparación con la concentración de péptido agregado, ajustado a una ecuación logística de cuatro parámetros.

Mediante el uso de métodos de fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo, se llevan a cabo ensayos para determinar la potencia intrínseca de las moléculas de ejemplo y 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 mediante una curva estándar. Las curvas de respuesta a la dosis de los compuestos

se representan como el porcentaje de estimulación normalizado 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. Cada valor relativo de EC50 para el cálculo de la media geométrica se determina a partir de un ajuste de curva.

Las curvas de concentración-respuesta de los compuestos se representan como el porcentaje de estimulación normalizado 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. Las estadísticas de resumen de EC50 se calculan de la siguiente manera:

Media geométrica:

$GM = 10^{(media\ aritmética\ de\ valores\ log\ 10\ transformados\ de\ EC50)}$. Se informa el error estándar de la media:

$SEM = media\ geométrica \times (desviación\ estándar\ de\ valores\ log\ 10\ transformados\ de\ EC50 / raíz\ cuadrada\ de\ la\ cantidad\ de\ ejecuciones) \times log_e\ de\ 10$.

La transformación logarítmica representa los valores de EC50 que se encuadran en una escala multiplicativa, en lugar de una aritmética.

Cada vez que se realiza el ensayo, se ejecutan los péptidos de prueba más los ligandos nativos GIP, GLP-1 y glucagón, el amortiguador solo como valor inicial

(mínimo), y se usa la concentración más alta de los respectivos estándares de GIP, GLP-1 y glucagón como máximo para los cálculos. Para ilustrar, como se muestra en el Ejemplo 1, el péptido de prueba se evalúa en 8 ejecuciones del ensayo de hGIPR cAMP. Para evitar dudas, las EC50 de la amida de hGIP, la amida de hGLP-1 y glucagón en la Tabla 2 son ilustrativas de los valores de media geométrica de una serie de 18 valores de ensayo, y los valores variarán cada día en comparación con el amortiguador cero. En consecuencia, cada ejemplo usará la media geométrica de esos valores para normalizar las ejecuciones del ensayo de los ejemplos.

Tabla 2. Activación funcional de hGcgR, hGIPR y hGLP-1R en presencia de 0,1 % de caseína.

Ejemplo o comparador	hGcgR cAMP Rel EC₅₀ nM (SEM, n)	hGIPR cAMP Rel EC₅₀ nM (SEM, n)	hGLP1R cAMP Rel EC₅₀ nM (SEM, n)
hGIP-NH ₂	>5000 (n=5)	0,122 (0,00449, n=494)	>500 (n=3)
hGlucagón	0,0116 (0,000315, n=306)		9,79 (1,83, n=3)
hGLP-1(7-36) NH ₂	>500 (n=4)		0,0549 (0,00149, n=490)
1	575 (369, n=4)	0,0476 (0,0253, n=8)	>5000 (n=5)
2	608 (n=11)	0,0123 (0,00751, n=15)	>5000 (n=11)
3	1250 (398, n=6)	0,0178 (0,00680, n=9)	>5000 (n=6)
4	1690 (n=5)	0,0182 (0,00783, n=5)	>5000 (n=5)
5	>5000 (n=5)	0,0148 (0,00434, n=5)	>5000 (n=5)
6	>5000 (n=4)	0,0176 (0,00714, n=14)	>5000 (n=4)

7	>5000 (n=2)	0,0219 (0,00294, n=2)	>5000 (n=2)
8	295 (62,9, n=2)	0,0268 (0,000153, n=3)	>5000 (n=2)
9	>5000	0,165	>100
10	>5000	0,611	>100
11	445	0,0738	>100
12	>5000	0,0911	>100
13	>5000	0,129	>100
14	>5000	0,340	>100
15	>5000	0,282	>100
16	>5000 (n=2)	0,00937 (0,00210, n=2)	>5000 (n=2)
17	>5000 (n=2)	0,0135 (0,00227, n=2)	>5000 (n=2)
18	>5000 (n=2)	0,00656 (0,00228, n=2)	>5000 (n=2)
19	>5000 (n=2)	0,00992 (0,00148, n=3)	>5000 (n=2)
20	>5000 (n=2)	0,00933 (0,00112, n=3)	>5000 (n=2)
21	>5000 (n=3)	0,291 (0,0766, n=4)	>5000 (n=3)
22	1250 (487, n=3)	0,0345 (0,00839, n=4)	>5000 (n=3)

23	>5000 (n=5)	0,0192 (0,00529, n=4)	206 (13,8, n=4)
24	>5000 (n=2)	0,0699 (0,0155, n=3)	>5000 (n=2)
25	>5000 (n=2)	0,0155 (0,00237, n=3)	8,39 (2,46, n=4)
26	>5000 (n=2)	0,00991 (0,00277, n=2)	5,69 (2,48, n=4)
27	>5000 (n=2)	0,0132 (0,000266, n=2)	>5000 (n=2)
28	>5000 (n=2)	0,0118 (0,00124, n=2)	>5000 (n=2)
29	>5000 (n=4)	0,00679 (0,00193, n=4)	>5000 (n=4)
30	>5000 (n=4)	0,00572 (0,00160, n=4)	>5000 (n=4)
31	1750 (886, n=3)	0,0148 (0,00426, n=3)	>5000 (n=3)
32	>5000 (n=2)	0,00469 (0,00199, n=3)	>5000 (n=2)
33	>5000	0,0551	>5000
34	913 (586, n=2)	0,0177 (0,00478, n=2)	462 (321, n=2)
35	>5000	0,0125	>5000
36	>5000	0,0543	1080

37	>5000	0,0360	61,1
38	>5000	0,0368	1390
39	>5000	0,0112	3330
40	>5000	0,0330	2330
41	>5000	0,0281	1800
42	>5000	0,0091	815
43	>5000	0,0154	1020
44	>5000	0,0084	1180
45	1690 (n=2)	0,0490 (0,000420, n=2)	>5000 (n=2)
46	863 (n=2)	0,0294 (0,0166, n=2)	>5000 (n=2)
47	757 (492, n=2)	0,0234 (0,00230, n=2)	>5000 (n=2)
48	1360	0,0166	>5000
49	2860 (620, n=6)	0,0156 (0,00569, n=7)	>5000 (n=6)
50	371,0	0,0212	41,0
51	308,0	0,0166	24,7
52	337,0	0,0194	>5000
53	344 (136, n=2)	0,0194 (0,00603, n=3)	>5000 (n=2)
54	>5000	0,0540	>5000
55	>5000	0,0170	>5000 (n=2)

56	>5000	0,0169	>5000 (n=2)
57	886 (430, n=2)	0,0177 (0,00819, n=3)	>5000 (n=2)
58	>5000	0,0183 (0,00544, n=2)	>5000
59	>5000	0,0202	>5000
60	>5000	0,0369	71
61	>5000	0,0167	192
62	>5000	0,0116	58,2
63	1170	0,0398	>5000
64	3070	0,0448	>5000
65	850	0,0346	>5000
66	>5000	0,0786	>5000
67	>5000	0,0627	>5000
68	3030 (n=2)	0,0768	>5000 (n=2)
69	803 (237, n=2)	0,0302 (0,00976, n=2)	>5000
70	3560	0,0254	>5000
71	581	0,0721	>5000
72	>5000	0,0182	>5000
73	>5000	0,0151	>5000
74	627	0,0167	>5000
75	2170	0,0182	>5000

76	1200	0,0154	>5000
77	2660	0,0265	>5000
78	3000 (n=2)	0,0125 (0,00185, n=2)	>5000 (n=2)
79	>5000	0,0316	>5000
80	>5000 (n=2)	0,0777 (0,0223, n=2)	>5000 (n=2)
81	>5000 (n=2)	0,0282 (0,00791, n=2)	>5000 (n=2)
82	3790 (n=2)	0,0391 (0,00658, n=2)	>5000 (n=2)
83	>5000	0,0432	>5000
84	>5000	0,0340	>5000
85	>5000	0,0359	>5000
86	>5000	0,0300	>5000
87	>5000	0,0107	>5000
88	1670	0,0031	>5000
89	>5000 (n=2)	0,00687 (0,00245, n=2)	>5000 (n=2)
90	>5000	0,0272	>5000
91	289	0,0321	530
92	>5000 (n=2)	0,0191 (0,00110, n=2)	>5000 (n=2)
93	>5000 (n=2)	0,00482 (0,000315, n=2)	884 (n=2)

94	>5000 (n=4)	0,00436 (0,00186, n=4)	1090 (442, n=4)
95	>5000	0,0272 (0,0110, n=2)	>5000
96	>5000	0,0251	>5000
97	>5000	0,0090	2510
98	>5000 (n=2)	0,00718 (0,00331, n=3)	649 (369, n=2)
99	>5000	0,00454 (0,000120, n=2)	>5000
100	>5000	0,0224	>5000
101	>5000 (n=2)	0,0396 (0,00639, n=2)	>5000 (n=2)
102	>5000 (n=2)	0,0166 (0,00337, n=2)	>5000 (n=2)
103	>5000 (n=2)	0,0129 (0,00901, n=2)	>5000 (n=2)
104	>5000	0,0165	>5000
105	>5000	0,0179	>5000
106	>5000	0,0140	>5000
107	>5000	0,0199	>5000
108	>5000	0,0088	>5000
109	>5000	0,0113	>5000
110	>5000	0,0071	>5000
111	>5000	0,0065	>5000

112	>5000	0,0041	>5000
113	>5000 (n=3)	00,0142 (0,0108, n=3)	>5000 (n=3)
114	>5000	0,0075	>5000
115	>5000	0,0372	>5000
116	>5000	0,0280	>5000
117	>5000	0,0617	>5000
118	>5000	0,0611	>5000
119	>5000	0,0220	>5000
120	>5000	0,0228	>5000
121	>5000	0,0196	>5000
122	>5000	0,0100	>5000

Como se demuestra mediante los datos en la Tabla 2, los compuestos de ejemplo de la presente invención son cAMP estimulantes muy potentes a partir de GIPR humano en presencia de 0,1 % de caseína.

ESTUDIOS IN VIVO

Farmacocinética en *Macaca fascicularis* macho

La farmacocinética de los Ejemplos seleccionados se evalúa después de una única administración subcutánea de 50 nmol/kg a *Macaca fascicularis* macho. Las muestras de sangre se recolectan durante 504 horas y las concentraciones plasmáticas individuales resultantes se utilizan para calcular los parámetros farmacocinéticos. Las concentraciones de péptido en plasma (K3 EDTA) se determinan mediante un método de LC/MS calificado que mide la masa intacta del

compuesto. Cada péptido y un análogo como estándar interno se extraen de 100 % de plasma de *Macaca fascicularis* mediante un método de precipitación de proteínas. Los instrumentos se combinan para la detección mediante LC/MS. Las medias de parámetros farmacocinéticos se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Media de parámetros farmacocinéticos de péptidos después de una única administración subcutánea de 50 nmol/kg a *Macaca fascicularis* macho.

Ejemplo	T_{1/2} (h)	T_{máx} (h)	C_{máx}/dosis (kg*nmol//nmol)	AUC_{inf}/dosis(h*k g*nmol//nmol)	CL/F (ml/h/kg)
1	71,1	24	7,20	786	1,27
2	51,8	6	6,92	624	1,61
3	88,8	60	12,1	1764	0,57
4	124	6	8,71	1387	0,72
5	128	120	12,0	2262	0,44
6	129	6	7,83	1382	0,77
7	109	9	10,1	1603	0,63

Abreviaturas: T_{1/2} = semivida, T_{máx} = tiempo hasta la concentración máxima, C_{máx}/dosis = concentración en plasma máxima dividida por la dosis, AUC_{inf}/dosis = AUC_{inf} dividida por dosis, CL/F = depuración/biodisponibilidad. Notas: los datos son la media, donde n=2/grupo.

Como se ve en la **Tabla 3**, los resultados de este estudio para los péptidos de ejemplo evaluados son consistentes con un perfil farmacocinético extendido.

Farmacocinética en ratas Sprague Dawley macho después de la administración subcutánea

La farmacocinética de los Ejemplos seleccionados se evalúa después de una única administración subcutánea (SC) de 100 nmol/kg a ratas Sprague Dawley macho. Se recolectan muestras de sangre durante 168 horas después de la administración SC. Los parámetros farmacocinéticos se calculan mediante el uso de concentraciones en plasma individuales. Se usa un método de LC/MS calificado que mide la masa intacta del ejemplo para determinar las concentraciones en plasma (K3 EDTA). Cada péptido y un análogo como estándar interno se extraen de 100 % de plasma de rata mediante un método de precipitación de proteínas. Los instrumentos se combinan para la detección mediante LC/MS. Las medias de parámetros farmacocinéticos para los ejemplos se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Media (+/- SD) de parámetros farmacocinéticos de péptidos después de una única administración subcutánea de 100 nmol/kg a ratas Sprague Dawley macho.

Ejemplo	T_{1/2} (h)	T_{máx} (h)	C_{máx}/dosis (kg*nmol/l/nmol)	AUC_{inf}/dosis(h *kg*nmol/l/nmol	CL/F (ml/h/kg)
1	37,4	24	3,62	280	3,57
2	26,9	12	5,47	304	3,30
3	24,9	12	3,03	130	7,67
5	27,1	24	4,61	239	4,20
6	34,8	24	4,07	271	3,69

Abreviaturas: T_{1/2} = semivida, T_{máx} = tiempo hasta la concentración máxima, C_{máx}/dosis = concentración en plasma máxima dividida por la dosis, AUC_{inf}/dosis = AUC_{inf} dividida por dosis, CL/F = depuración/biodisponibilidad. Notas: los datos son la media, donde n=3/grupo, excepto para el Ejemplo 3, donde los datos provienen de n=1 animal.

Como se ve en la Tabla 4, los resultados de este estudio mediante el uso de estos péptidos de ejemplo son consistentes con un perfil farmacocinético extendido.

Efecto *in vivo* en la secreción de insulina en ratas Wistar macho

Ratas Wistar macho con cánulas en la arteria femoral y la vena femoral (Envigo, Indianápolis, IN) (280-320 gramos) se alojan individualmente en jaulas de policarbonato con tapas de filtro. Las ratas se mantienen en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 h (las luces se encienden a las 6:00 a. m.) a 21 °C y reciben comida y agua desionizada a demanda. Las ratas se aleatorizan según el peso corporal, se les administró 1,5 ml/kg por vía subcutánea (s.c.) a dosis de 0,3, 1,0, 3, 10, 30 y 100 nmol/kg durante 16 horas antes de la administración de glucosa y luego se mantuvieron en ayunas. Los animales se pesan y se anestesian con pentobarbital sódico dosificado por vía intraperitoneal (i.p.) (65 mg/kg, 30 mg/ml). En el tiempo 0, se recolecta una muestra de sangre en tubos de EDTA, y después de esto se administra glucosa por vía intravenosa (i.v.) (0,5 mg/kg, 5 ml/kg). Las muestras de sangre se recolectan para determinar los niveles de glucosa e insulina a los 2, 4, 6, 10, 20 y 30 minutos después de la administración intravenosa de glucosa. Los niveles de glucosa en plasma se determinan mediante el uso de un analizador de química clínica. La insulina en plasma se determina mediante un ensayo de electroquimioluminiscencia (Meso Scale, Gaithersburg, MD). Las AUC de glucosa e insulina se examinan en comparación con el control de vehículo con n=5 animales por grupo. Se presentan los resultados (SEM)(N).

Tabla 5: Efecto de los compuestos de ejemplo sobre la secreción de

insulina durante la prueba de tolerancia a la glucosa intravenosa.

Dosis (nmol/kg, s.c.)							
Ejemplo	0,0	0,3	1,0	3,0	10	30	100
3	38,3	43,3	45,1	53,3	64,9	116,3	133,6
	(8,8)	(0,8)	(8,8)	(6,5) (5)	(9,3) (5)	(28,6)	(16,1)
	(5)	(5)	(5)			(4)	(5)
5	35,9	36,2	45,3	80,6	122,0	144	212,7
	(7,5)	(4,4)	(6,1)	(6,4) (5)	(5,9) (5)	(16,4)	(19,4)
	(5)	(5)	(5)			(5)	(5)
6	39,5	34,7	54,2	75,8	100,2	135,4	166,5
	(2,2)	(3,6)	(6,8)	(10,3)	(15,6)	(22,9)	(21,6)
	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)	(5)

Los datos proporcionados por la Tabla 5 demuestran un aumento dependiente de la dosis en la secreción de insulina.

Tabla 6: Secreción de insulina ivGTT mostrada por los siguientes datos:

Secreción de insulina (ivGTT)	
Ejemplo	(ED50, nmol/kg) (SEM, n)
3	17,1 (n = 1)
5	18,4 (n = 1)
6	12,9 (n = 1)

Los datos proporcionados por la Tabla 6 demuestran un aumento dependiente de la dosis en la secreción de insulina.

Evaluación de inmunogenicidad de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 5 y 6

El propósito de este estudio es determinar el potencial relativo para la inmunogenicidad clínica de los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 5 y 6.

Métodos:

Ensayo de linfocitos T CD4+: se usa el ensayo de linfocitos T CD4+ para comparar los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 5 y 6 para determinar el potencial de inducir una respuesta inmunitaria *in vivo* de acuerdo con los métodos conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Jones *et al.* (2004) *J. Interferon Cytokine Res.* 24:560-572; y Jones *et al.* (2005) *J. Thromb. Haemost.* 3: 991-1000), donde una evaluación de péptidos y anticuerpos monoclonales probados clínicamente muestra cierto grado de correlación entre la proliferación de células T observada *in vitro* y la

inmunogenicidad en la clínica. Los tratamientos terapéuticos con proteínas que inducen menos del 30 % de respuesta positiva en el ensayo de proliferación de linfocitos T CD4+ están asociados con un bajo riesgo de inmunogenicidad. Brevemente, para evaluar la propensión a una respuesta inmunógena clínica a los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 5 y 6, se preparan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) con disminución de linfocitos T CD8+ y se etiquetan con succinimidil éster de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE; Invitrogen) de una cohorte de 10 donantes sanos con diversos haplotipos de clase II de antígeno leucocitario humano (HLA). Cada donante se evalúa por triplicado con control de medios de 2,0 ml, hemocianina de lapa californiana (KLH; 0,33 μ M) y los compuestos de los Ejemplos 1, 2, 3, 5 y 6 (0,33 μ M). Los cultivos se incuban durante 7 días a 37 °C con 5 % de CO₂. El día 7, las muestras se analizan mediante citometría de flujo con un BD LSR II Fortessa (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ), equipado con un muestreador de alto rendimiento (HTS). Los datos se analizan mediante el uso del software FlowJo® (FlowJo, LLC/TreeStar; Ashland, OR).

Resultados y análisis

Todos los donantes producen una respuesta de linfocitos T positiva contra KLH (100 %). El análisis de la frecuencia y magnitud de la respuesta de linfocitos T CD4+ para los compuestos de ejemplo se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Respuestas de linfocitos T CD4+ para los compuestos de ejemplo y control positivo (KLH).

Ejemplo o comparador	% de respuesta del donante (n=10)	Mediana de fuerza de respuesta en donantes positivos (CDI)
KLH	100 %	164,285 (n=10)
Ejemplo 1	0 %	NA (n=0)
Ejemplo 2	10 %	2,69 (n=1)
Ejemplo 3	0 %	NA (n=0)
Ejemplo 5	0 %	NA (n=0)
Ejemplo 6	0 %	NA (n=0)

Índice de división celular ("CDI"): proporción de linfocitos T CD4+ divididos con respecto a la cantidad total de linfocitos T CD4+ en muestras estimuladas en comparación con no estimuladas.

Estos datos muestran que la frecuencia de respuesta positiva de linfocitos T CD4+ (CDI>2,5) fue baja para los compuestos de ejemplo evaluados, y la magnitud de la respuesta en el donante positivo del grupo del Ejemplo 2 fue baja (CDI<3). Por lo tanto, en función de este ensayo, estos compuestos tienen un bajo riesgo de inmunogenicidad.

Secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO:1

GIP

1-42

(humano)

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO:2

Amida de GLP-1 (7-36) (humana)

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR-NH2

SEQ ID NO:3

Glucagón (humano) HSQGTFTSDYSKYLDSRRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO:4

Z1X1X2EGTX6ISDYSIX13LDX16X17X18QX20X21X22VX24X25X26LX28X29

GPSSGAPPPSZ2

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de la fórmula:

Z1X1X2EGTX6ISDYSIX13LDX16X17X18QX20X21X22

VX24X25X26L

X28X29GPSSGAPPPSZ2 (SEQ ID NO:4) en donde:

Z1 es una modificación del grupo amino del terminal N en donde la modificación se selecciona del grupo que consiste en acetilo y ausente;

X1 se selecciona del grupo que consiste en Y y D-Tyr;

X2 se selecciona del grupo que consiste en Aib, A y D-Ala;

X6 se selecciona del grupo que consiste en F, α MeF, Iva, L, α MeL y α MeF(2F);

X13 se selecciona del grupo que consiste en α MeL, A, L y Aib;

X16 se selecciona del grupo que consiste en K, E y Orn;

X17 se selecciona del grupo que consiste en I y K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H;

X18 se selecciona del grupo que consiste en H, A y R;

X20 se selecciona del grupo que consiste en Aib y Q;

X21 se selecciona del grupo que consiste en D y E;

X22 se selecciona del grupo que consiste en F y α MeF;

X24 se selecciona del grupo que consiste en E, N, Q y D-Glu;

X25 se selecciona del grupo que consiste en Y, 4-Pal, W y α MeY;

X26 se selecciona del grupo que consiste en L y K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ -Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H;

X28 se selecciona del grupo que consiste en E y A;

X29 se selecciona del grupo que consiste en G, A, Q y T; q se

selecciona del grupo que consiste en 16 y 18; y

Z2 está ausente o es una modificación del grupo del terminal C, en donde la modificación es amidación;

en donde uno y solo uno seleccionado de X17 y X26 es $K(2-[2-(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_q\text{-CO}_2\text{H}$; o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este.

2. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde X1 es Y y Z1 está ausente.
3. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde X2 es Aib.
4. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde:
X6 se selecciona del grupo que consiste en F y $\alpha\text{MeF}(2\text{F})$.
5. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde:
X13 se selecciona del grupo que consiste en L y αMeL .
6. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde X16 es K u Orn.
7. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 6, en donde X16 es K.

8. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde X18 es H.
9. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde X20 es Aib; y X22 es F.
10. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde X21 es D.
11. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde X25 es 4-Pal o Y.
12. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde:

X17 es $K(2-[2-(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_q\text{-CO}_2\text{H}$; y
X26 es L.
13. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde X17 es I; y X26 es $K(2-[2-(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})2-(\gamma\text{-Glu})\text{-CO}-(\text{CH}_2)_q\text{-CO}_2\text{H}$.
14. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde q es 16.
15. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico

de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde q es 18.

16. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde:

X1 es Y y Z1 está ausente;

X2 se selecciona del grupo que consiste en Aib y D-Ala; X6 es F;

X13 se selecciona del grupo que consiste en α MeL y L;

X16 se selecciona del grupo que consiste en K y Orn;

X18 se selecciona del grupo que consiste en H y A; X20 es Aib;

X22 es F;

X24 se selecciona del grupo que consiste en E, N y D-Glu; X25 se selecciona del grupo que consiste en Y, 4-Pal y W;

X28 se selecciona del grupo que consiste en E y A;

X29 se selecciona del grupo que consiste en G, A y Q; q se selecciona del grupo que consiste en 16 y 18.

17. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 16, en donde:

X2 es Aib;

X13 es α MeL;

X18 es H;

X24 se selecciona del grupo que consiste en E y D-Glu;

X25 se selecciona del grupo que consiste en Y y 4-Pal;

X28 es E;

X29 se selecciona del grupo que consiste en G y A.

18. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico

de este, de acuerdo con la reivindicación 17 en donde: X17 es K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H; y X26 es L.

19. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 17 en donde: X17 es I; y X26 es K(2-[2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(γ-Glu)-CO-(CH₂)_q-CO₂H.
20. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el compuesto se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:10 y SEQ ID NO:11.
21. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el compuesto es SEQ ID NO:7.
22. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el compuesto es SEQ ID NO:8.
23. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el compuesto es SEQ ID NO:10.
24. Un método para el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en diabetes mellitus, obesidad y síndrome metabólico, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
25. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la afección es

obesidad.

26. Un método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la afección es diabetes mellitus tipo 2.
27. Un método para tratar la diabetes en un paciente que recibe tratamiento con insulina, que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22 a un paciente que lo necesite.
28. Una composición farmacéutica que comprende el compuesto, o una sal de este aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, y al menos un portador, diluyente o excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico.
29. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, para su uso en el tratamiento de una afección seleccionada del grupo que consiste en diabetes mellitus, obesidad y síndrome metabólico.
30. Un compuesto, o una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de este, de acuerdo con la reivindicación 29, en donde la afección es diabetes mellitus tipo 2.

RESUMEN

La presente invención se refiere a compuestos que tienen actividad en el receptor de polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) humano. La presente invención se refiere además a compuestos que tienen una duración de acción prolongada en el receptor de GIP. Tales compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de la diabetes, que incluye diabetes mellitus tipo 2 ("T2DM"). Además, los compuestos pueden ser útiles en el tratamiento de la obesidad.