

Prezenta invenție se referă la domeniul medicinei. Mai exact, prezenta invenție se referă la compuși peptidomimetici ai incretinei duali care agonizează receptorii atât pentru polipeptida insulinotropică dependentă de glucoză (GIP) umană cât și peptida-1 asemănătoare glucagonului (GLP-1), și pot fi utili pentru tratarea diabetului zaharat de tip 2 (T2D).

T2D este cea mai întâlnită formă de diabet care reprezintă aproximativ 90% dintre toate tipurile de diabet. T2D este caracterizat prin niveluri ridicate de glucoză în sânge cauzate de rezistența la insulină. Standardul actual al îngrijirii pentru T2D include dietă și exerciții împreună cu medicamentele orale și injectabile disponibile de scădere a glucozei. Cu toate acestea, mulți pacienți cu T2D rămân încă necorespunzător controlați. Mimeticele incretinei comercializate în prezent sau inhibitorii dipeptidil peptidazei IV (DPP-IV) utilizează doar un singur mecanism stabilit de acțiune pentru controlul glicemic. Este necesar un compus pentru T2D care să utilizeze un mecanism dual de acțiune.

GIP este o peptidă regulatoare gastrointestinală de 42 de aminoacizi care joacă un rol fiziologic în homeostazia glucozei prin stimularea secreției de insulină din celulele beta pancreatice în prezența glucozei și protejând celulele beta pancreatice. GLP-1 este o peptidă de 37 de aminoacizi care stimulează secreția de insulină, protejează celulele beta pancreatice, și inhibă secreția de glucagon, golirea gastrică și ingerarea de alimente care conduce la pierderea în greutate. GIP și GLP-1 sunt cunoscute ca incretine; receptorul incretinei care semnalizează exercită o acțiune relevantă fiziologic critică pentru homeostazia glucozei. În fiziologia normală, GIP și GLP-1 sunt secretate în intestin după o masă, și aceste incretine amplifică răspunsul fiziologic la alimente incluzând senzația de sațietate, secreția de insulină, și dispunerea nutrienților. Pacienții cu T2D au răspunsurile la incretine alterate.

Dozarea analogilor GLP-1 s-a descoperit a fi limitată de efecte adverse, cum ar fi greață și vomă, și ca o consecință dozarea cel mai adesea nu poate atinge eficacitatea deplină pentru controlul glicemic și pierderea în greutate. GIP singură are o capacitate foarte modestă de a scădea glucoza la oamenii diabetici de tip 2. Atât GIP cât și GLP-1 native sunt inactivate rapid de către proteaza omniprezentă, DPP IV, și prin urmare, pot fi utilizate numai pentru control metabolic pe termen scurt.

Glucagonul este o peptidă de 29 de aminoacizi produsă de pancreas, și când este legat la receptorul de glucagon, semnalizează ficatului să elibereze glucoză conducând la o creștere a glucozei în sânge. GLP-2, o peptidă care asemenea GLP-1 este produsă din procesarea proglucagonului, este cunoscută a fi asociată cu proliferarea celulară din intestin. Astfel, stimularea receptorilor de glucagon și GLP-2 ar trebui să fie minimizată în timpul tratamentului cronic al pacienților cu T2D pentru a maximiza scăderea glucozei și a reduce potențialele riscuri cancerigene pe termen lung.

Anumiți analogi ai GIP au fost descriși ca prezentând atât activitate de GIP cât și de GLP-1 în WO 2013/164483, WO 2014/192284, și WO 2011/119657.

DPP IV este din clasa exopeptidazei a enzimelor proteolitice. Introducerea de aminoacizi nenaturali într-o secvență poate crește stabilitatea proteolitică a oricărei peptide date. Deși utilizarea de aminoacizi nenaturali poate ajuta cu stabilitatea peptidelor împotriva proteolizei DPP IV și a altor forme de degradare, s-a descoperit de către Solicitanți ca parte din prezenta invenție că aminoacizii nenaturali pot avea efecte neașteptate asupra echilibrului activității agoniste între GIP și GLP-1. Aminoacizii nenaturali de asemenea cresc probabilitatea ca o peptidă să poată fi văzută ca străină și să declanșeze reacții imunitare indezirabile, cum ar fi imunogenitatea umană și reacții la locul injectiei.

Acizii grași, prin motivele lor de legare a albuminei, pot îmbunătăți farmacocinetica unei peptide prin extinderea perioadei de înjumătățire, de exemplu. Deși utilizarea acizilor grași poate îmbunătăți perioada de înjumătățire a peptidei, s-a descoperit de către Solicitanți ca parte din prezenta invenție că lungimea, compoziția, și plasarea catenei

acidului gras și linkerul între peptidă și catena acidului gras pot avea efecte neașteptate asupra echilibrării activității agoniste a GIP și GLP-1.

S-a descoperit că tolerabilitatea anumitor analogi GLP-1 împiedică o doză de analog GLP-1 să atingă o eficacitate mai bună pentru controlul glicemic și pierderea în greutate. Cele mai frecvente efecte secundare atribuite analogilor GLP-1 sunt greața și voma dar unii compuși pot avea de asemenea un impact asupra ritmului cardiac. Axa HPA face parte dintr-un răspuns fiziologic la stres și GLP-1 s-a descoperit că stimulează axa HPA la șobolani conducând la niveluri crescute de corticosteron furnizând o potențială legătură cu evenimentele adverse cum ar fi ritmul cardiac crescut. Ca parte din prezenta invenție, solicitanții au descoperit în mod neașteptat că un compus din prezenta invenție nu a condus la niveluri ridicate de corticosteron așa cum s-a observat cu semaglutida la un model la șobolan și astfel posibil poate fi dozat până la niveluri mai ridicate de eficacitate decât agenții GLP-1R-selectivi.

Rămâne o necesitate de a furniza un compus care să fie un co-agonist echilibrat al receptorilor de GIP și GLP-1, dar să fie selectiv față de receptorii de glucagon și GLP-2 înrudiți. De asemenea, rămâne o necesitate de a furniza un compus cu activitate co-agonistă echilibrată a receptorilor de GIP și GLP-1 care să poată furniza pierderea în greutate dată fiind activitatea descoperită la modelele la animale. Suplimentar, rămâne o necesitate de a furniza un compus cu activitate co-agonistă echilibrată a receptorilor de GIP și GLP-1 care să ofere o stabilitate adecvată față de DPP IV și alte forme de degradare, dar să mențină în același timp un potențial scăzut de imunogenitate. De asemenea, rămâne o necesitate furnizarea unui compus cu activitate co-agonistă echilibrată a receptorilor de GIP și GLP-1 care să susțină dozarea potențială de o dată pe săptămână la oameni.

Corespunzător, anumiți compuși ai prezentei invenții au potențial mai scăzut pentru imunogenitate și reacții la locul injecției decât anumiți compuși co-agoniști ai GIP-GLP-1 din domeniu. Anumiți compuși ai prezentei invenții au potențialul de a produce pierdere în greutate la pacienți pe baza datelor privind cheltuielile de energie la animale. Mai mult, anumiți compuși ai prezentei invenții au o activitate co-agonistă echilibrată față de receptorii de GIP și GLP-1 și selectivitate față de ambii receptori de glucagon și GLP-2, un potențial de imunogenitate scăzut, și caracteristici farmacocinetice (PK) care susțin dozarea de o dată pe săptămână la oameni.

Corespunzător, o realizare a prezentei invenții furnizează un compus cu Formula I:

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

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu $([2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$ în care a este 1 până la 2 și b este 10 până la 20; X_3 este Phe sau 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 11), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I, în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu $([2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$ în care a este 1 până la 2 și b este 10 până la 18; X_3 este Phe; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I, în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu $([2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$ în care a este 1 până la 2 și b este 10 până la 18; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I, în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H în care a este 1 până la 2 și b este 14 până la 18; X_3 este Phe sau 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus în care b este 16 până la 18. Suplimentar, prezenta invenție furnizează un compus în care b este 18.

Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I, în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H în care a este 1 și b este 10 până la 18; X_3 este Phe sau 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I, în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H în care a este 2 și b este 10 până la 18; X_3 este Phe sau 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula I, în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_a$ -CO-(CH $_2$) $_b$ -CO $_2$ H în care a este 1 până la 2 și b este 10 până la 18; X_3 este Phe sau 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS; în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_1$ -CO-(CH $_2$) $_{18}$ -CO $_2$ H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 3), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAX $_3$ VQWLIAGGPSSGAPPPS; în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_2$ -CO-(CH $_2$) $_{18}$ -CO $_2$ H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 4), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS; în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_1$ -CO-(CH $_2$) $_{16}$ -CO $_2$ H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 5), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: YX $_1$ EGTFTSDYSIX $_2$ LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS; în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_2$ -CO-(CH $_2$) $_{16}$ -CO $_2$ H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 6), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: $YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS$ în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_2$ -CO-(CH $_2$) $_{18}$ -CO $_2$ H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 7), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: $YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAX_3VQWLIAGGPSSGAPPPS$ în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_1$ -CO-(CH $_2$) $_{16}$ -CO $_2$ H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 8), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: $YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAX_3VQWLIAGGPSSGAPPPS$ în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_2$ -CO-(CH $_2$) $_{16}$ -CO $_2$ H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 9), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus cu Formula: $YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQKAX_3VQWLIAGGPSSGAPPPS$ în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil) $_2$ -(γ Glu) $_1$ -CO-(CH $_2$) $_{18}$ -CO $_2$ H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 10), sau o sare acceptabilă farmaceutic a acesteia.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează o compoziție cuprinzând un compus din prezenta invenție cu un purtător, diluant, sau excipient acceptabil farmaceutic.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează o metodă de tratare a diabetului zaharat de tip 2, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează o metodă de tratare a diabetului zaharat de tip 2 cuprinzând în plus administrarea simultan, separat, sau secvențial în combinație cu o cantitate eficientă dintr-unul sau mai mulți agenți selectați dintre metformin, tiazolidindione, sulfoniluree, inhibitori ai dipeptidil peptidazei 4, și co-transportori de sodiu glucoză.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează o metodă pentru a îmbunătăți controlul glicemic la adulții cu diabet zaharat de tip 2, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție ca un adjuvant la dietă și exercițiu. Într-o realizare, prezenta invenție furnizează o metodă de gestionare a greutății cronice la adulții cu un indice inițial al masei corporale ≥ 27 și diabet zaharat de tip 2, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție ca un adjuvant la o dietă cu calorii reduse și activitate fizică crescută.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează o metodă pentru a trata sindromul metabolic, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează o metodă pentru a trata dislipidemia, obezitatea, și/sau steatoza hepatică asociate cu rezistență la insulină și diabet, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție. Suplimentar, prezenta invenție furnizează o metodă pentru a trata

fragilitatea sau a crește rezistența osoasă, cuprinzând administrarea la un pacient care are nevoie de aceasta, a unei cantități eficiente dintr-un compus din prezenta invenție.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în terapie. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în tratamentul diabetului zaharat de tip 2. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție în combinație simultană, separată, sau secvențială cu unul sau mai mulți agenți selectați dintre metformin, tiazolidindione, sulfoniluree, inhibitori ai dipeptidil peptidazei 4, și co-transportori de sodiu glucoză pentru utilizare în tratamentul diabetului zaharat de tip 2.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în controlul glicemic la adulții cu diabet zaharat de tip 2 ca un adjuvant la dietă și exercițiu. Într-o realizare, prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție pentru utilizare în gestionarea greutateii cronice la adulții cu un indice inițial al masei corporale ≥ 27 și diabet zaharat de tip 2 ca un adjuvant la o dietă cu calorii reduse și activitate fizică crescută.

Într-o realizare, prezenta invenție furnizează utilizarea unui compus din prezenta invenție pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului zaharat de tip 2. Într-o realizare suplimentară, prezenta invenție furnizează utilizarea unui compus din prezenta invenție în combinație simultană, separată, sau secvențială cu unul sau mai mulți agenți selectați dintre metformin, tiazolidindione, sulfoniluree, inhibitori ai dipeptidil peptidazei 4, și co-transportori de sodiu glucoză pentru fabricarea unui medicament pentru tratamentul diabetului zaharat de tip 2.

Prezenta invenție furnizează compuși care afișează o activitate echilibrată a GIP și GLP-1. Activitate echilibrată față de GIP și GLP-1 așa cum s-a utilizat în acest document se referă la un compus care are afinitate pentru receptorii GIP și receptorii GLP-1 într-un test *in vitro* de legare la un raport molar care este aproape de 1:1, cum ar fi 1:1 GLP-1/GIP, 2:1 GLP-1/GIP, 3:2 GLP-1/GIP, 1:2 GLP-1/GIP, sau 2:3 GLP-1/GIP.

Prezenta invenție furnizează compuși care afișează selectivitate pentru receptorii GIP și GLP-1 versus receptorii pentru glucagon și GLP-2. Termenul „selectivitate” sau „selectiv față de” când s-a utilizat în acest document pentru a se referi la activitatea GIP și GLP-1 în comparație cu activitatea glucagonului, se referă la un compus care afișează o potență de aproximativ 1000, 500, sau 100 de ori mai ridicată pentru GIP și GLP-1 față de glucagon atunci când sunt normalizate datele la testele *in vitro* de legare respective. Termenul „selectivitate” sau „selectiv față de” când s-a utilizat în acest document pentru a se referi la activitatea GIP și GLP-1 în comparație cu activitatea GLP-2, se referă la un compus care afișează o potență de 250, 200, 100, sau aproximativ 50 de ori mai ridicată pentru GIP și GLP-1 față de GLP-2 când sunt normalizate datele de la testele funcționale *in vitro* respective.

Prezenta invenție furnizează un compus din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul diabetului de tip 2. Prezenta invenție furnizează de asemenea un compus din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în tratamentul diabetului de tip 2, în care administrarea este subcutanată. Prezenta invenție furnizează de asemenea un compus din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia, pentru utilizare în combinație simultană, separată sau secvențială cu unul sau mai multe alte ingrediente active în tratamentul diabetului de tip 2. Într-o realizare, celălalt ingredient sau ingrediente active sunt medicamente orale disponibile în prezent de scădere a glucozei dintr-o clasă de medicamente care este considerată înainte de administrare standardul de îngrijire după cum s-a determinat de către ghidurile din industrie cum ar fi Asociația americană pentru diabet.

Compușii prezentei invenții utilizează un acid gras conjugat chimic la gruparea epsilon-amino a unei catene laterale de lizină. Acidul gras este conjugat la gruparea epsilon-amino a unei catene laterale de lizină printr-un linker. Linkerul cuprinde $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a$ în care a este 1 până la 2. Acidul gras și acidul gamma-glutamic din linker acționează ca lianți de albumină, și furnizează potențialul de a genera compuși care acționează îndelungat. Compușii prezentei invenții cuprind o lizină la poziția 20 care este modificată chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$ în care a este 1 până la 2 și b este 10 până la 20. Așa cum se arată în structurile chimice din Exemplele 1 și 2, prima unitate de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$ este legată la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a lizinei. A doua unitate de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$ este apoi atașată la gruparea amino a primei unități de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$. Apoi, prima unitate de γGlu este atașată la gruparea amino din a doua unitate de $[2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil}$ prin gruparea γ -carboxil a catenei laterale. Când $a = 2$, a doua unitate de γGlu este atașată la gruparea α -amino din prima unitate de γGlu prin gruparea γ -carboxil a catenei laterale. În final, acidul gras simetric este atașat la gruparea α -amino din prima (când $a = 1$) sau a doua (când $a = 2$) unitate de γGlu .

Compușii invenției sunt preferabil formulați precum compoziții farmaceutice administrate pe căi parenterale (*de exemplu*, subcutanat, intravenos, intraperitoneal, intramuscular, sau transdermal). Astfel de compoziții farmaceutice și procedee pentru prepararea acestora sunt bine cunoscute în domeniu. (Vezi, *de exemplu*, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, Ediția a 21-a, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). Calea preferată de administrare este subcutanată.

Compușii prezentei invenții pot reacționa cu oricare dintr-un număr de acizi anorganici și organici pentru a forma săruri de adiție cu acid acceptabile farmaceutic. Sărurile acceptabile farmaceutic și metodologia comună pentru prepararea lor sunt bine cunoscute în domeniu. Vezi, *de exemplu*, P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Ediția a 2-a revizuită (Wiley-VCH, 2011); S.M. Berge, et al., „Săruri farmaceutice”, Journal of Pharmaceutical Sciences, Vol. 66, nr. 1, ianuarie 1977. Sărurile acceptabile farmaceutic din prezenta invenție includ sărurile de trifluoroacetat, clorhidrat, și acetat.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „cantitate eficientă” se referă la cantitatea sau doza de compus din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestuia care, după administrarea unei singure sau de multiple doze pacientului, furnizează efectul dorit la pacientul sub diagnostic sau tratament. O cantitate eficientă poate fi determinată cu ușurință de către diagnosticianul curant, ca o persoană calificată în domeniu, prin utilizarea tehnicilor cunoscute și prin observarea rezultatelor obținute în circumstanțe analoge. În determinarea cantității eficiente pentru un pacient, sunt considerați un număr de factori de către diagnosticianul curant, incluzând, dar fără limitare la: specia de mamifer; dimensiunea, vârsta, și sănătatea sa generală; boala sau tulburarea specifică implicată; gradul sau implicarea sau severitatea bolii sau tulburării; răspunsul pacientului individual; compusul particular administrat; modul de administrare; caracteristicile de biodisponibilitate ale preparatului administrat; regimul de dozare selectat; utilizarea de medicație concomitentă; și alte circumstanțe relevante.

Așa cum s-a utilizat în acest document, termenul „tratarea” sau „a trata” include împiedicarea, încetinirea, oprirea, sau inversarea progresului sau severității unui simptom sau tulburări existente.

Așa cum s-a utilizat în acest document, „semaglutidă” se referă la un analog de GLP-1 sintetizat chimic care are structura principală a peptidei și structura generală a compusului a celei găsite la Numărul de înregistrare CAS 910463-68-2.

Anumiți compuși ai prezentei invenții sunt în general eficienți peste un interval larg de dozare. De exemplu, dozajele pentru dozarea de o dată pe săptămână pot cădea în

intervalul de aproximativ 0,05 până la aproximativ 30 mg per persoană per săptămână. Anumiți compuși ai prezentei invenții pot fi dozați zilnic. Suplimentar, anumiți compuși ai prezentei invenții pot fi dozați o dată pe săptămână.

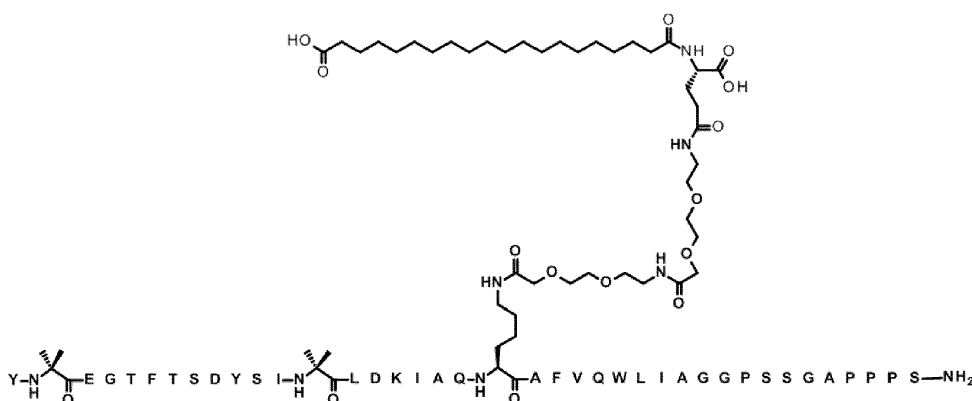
Secvențele de aminoacizi din prezenta invenție conțin codurile standard cu o singură literă sau trei litere pentru cei douăzeci de aminoacizi care apar în mod natural. Suplimentar, „Aib” este acid alfa amino izobutiric, și „1-Nal” este 1-Naftilalanină.

Prezenta invenție cuprinde de asemenea noi intermediari și procedee utile pentru sinteza compușilor din prezenta invenție, sau o sare acceptabilă farmaceutic a acestora. Intermediarii și compușii prezentei invenții pot fi preparați prin o varietate de proceduri cunoscute în domeniu. În particular, procedeul utilizând sinteza chimică este ilustrat în Exemplele de mai jos. Etapele de sinteză specifice pentru fiecare dintre căile descrise pot fi combinate în diferite moduri pentru a prepara compușii prezentei invenții, sau sărurile acestora. Reactivii și materiile prime sunt disponibile cu ușurință cuiva având calificare obișnuită în domeniu. Se înțelege că aceste Exemple nu sunt intenționate să limiteze scopul invenției în nici un fel.

EXEMPLUL 1

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 3) sare trifluoroacetat



Structura de mai sus conține codul standard de aminoacizi cu o singură literă cu excepția resturilor Aib₂, Aib₁₃ și K₂₀ unde structurile acestor resturi de aminoacizi au fost expandate.

Peptida în conformitate cu SEQ ID NO: 3 din prezenta invenție este generată prin sinteză peptidică în fază solidă utilizând o strategie Fmoc/t-Bu efectuată pe un sintetizator de peptide automat Symphony (PTI Protein Technologies Inc.) începând de la rășina RAPP AM-Rink Amide și cu cuplaje utilizând 6 echivalenți de aminoacid activați cu diizopropilcarbodiimidă (DIC) și hidroxibenzotriazol (HOBt) (raport molar de 1:1:1) în dimetilformamidă (DMF) timp de 90 min la 25°C.

Cuplaje extinse (4 ore fiecare) pentru Pro₃₁, Trp₂₅, Gln₂₄, Val₂₃, Phe₂₂, Lys₂₀, Gly₄, Glu₃ și Aib₂ sunt necesare pentru a îmbunătăți calitatea peptidei brute. Un bloc de construcție Fmoc-Lys(Alloc)-OH este utilizat pentru cuplarea Lys₂₀ (grupare de protecție ortogonală) pentru a permite atașarea specifică situsului a radicalului de acid gras mai târziu în procedeul sintetic. Următoarele condiții sunt utilizate pentru cuplarea Fmoc-Ile-OH la poziția 12: Fmoc-Ile-OH (6 echiv), PyBOP (6 echiv), și DIEA (12 echiv) în DMF timp

Peptida în conformitate cu SEQ ID NO: 4 din prezenta invenție este sintetizată în mod similar cum s-a descris mai sus în Exemplul 1. Următoarele condiții sunt utilizate

pentru cuplarea Fmoc-INal-OH la poziția 22: Fmoc-INal-OH (6 echiv), PyBOP (6 echiv), și DIEA (12 echiv) în DMF timp de 4 ore la 25°C.

EXEMPLUL 3

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 5), sare trifluoroacetat

Compusul în conformitate cu SEQ ID NO: 5 din prezenta invenție este sintetizat în mod similar cum s-a descris mai sus pentru Exemplul 1.

EXEMPLUL 4

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 6), sare trifluoroacetat

Compusul în conformitate cu SEQ ID NO: 6 din prezenta invenție este sintetizat în mod similar cum s-a descris mai sus pentru Exemplul 1.

EXEMPLUL 5

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 7), sare trifluoroacetat

Compusul în conformitate cu SEQ ID NO: 7 din prezenta invenție este sintetizat în mod similar cum s-a descris mai sus pentru Exemplul 1.

EXEMPLUL 6

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 8), sare trifluoroacetat

Compusul în conformitate cu SEQ ID NO: 8 din prezenta invenție este sintetizat în mod similar cum s-a descris mai sus pentru Exemplul 1.

EXEMPLUL 7

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X₃ este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 9) sare trifluoroacetat

Compusul în conformitate cu SEQ ID NO: 9 din prezenta invenție este sintetizat în mod similar cum s-a descris mai sus pentru Exemplul 1.

EXEMPLUL 8

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃ VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală (SEQ ID NO: 10), sare trifluoroacetat

Compusul în conformitate cu SEQ ID NO: 10 din prezenta invenție este sintetizat în mod similar cum s-a descris mai sus pentru Exemplul 1.

TESTE

Sunt furnizate mai jos condițiile și datele pentru Exemplele din mai multe teste: funcția și selectivitatea *in vitro*, profilarea imunogenității, farmacocinetica, și modele de diabet de tip 2 *in vivo*.

Funcția și selectivitatea *in vitro*

Potența legării *in vitro* la receptorii umani de GLP-1 și GIP

Potența legării *in vitro* a compușilor din prezenta invenție la receptorii umani de GIP și GLP-1 este evaluată prin măsurarea afinităților de legare, ca K_i, utilizând membrane celulare brute obținute de la linii celulare clonale care supraexprimă fie ADNc al GLP1R uman fie ADNc al GIP-R uman.

Testul de legare la receptorul polipeptidic insulinotrop dependent de glucoză uman utilizează hGIP-R (Usdin,T.B., Gruber,C., Modi,W. și Bonner,T.I., GenBank: AAA84418,1) clonat în plasmida pcDNA3.1 (Promega)-NeoR. Plasmida hGIP-R-pcDNA3.1/Neo este transfectată în Celule ovariene de hamster chinezesc, CHO-S, pentru culturi în suspensie și este selectată în prezența a 500 μg/mL Geneticin (Invitrogen).

Membranele plasmatiche brute sunt preparate utilizând celule din cultura în suspensie. Celulele sunt lizate pe gheață în tampon hipotonic conținând 25 mM Tris HCl, pH 7.5, 1 mM MgCl₂, DNAza1, 20 μ/mL, și Inhibitori Roche Complete™ fără EDTA. Suspensia de celule este omogenizată cu un omogenizator Dounce din sticlă utilizând un pistil Teflon® timp de 25 de lovături. Omogenatul este centrifugat la 4°C la 1800 x g timp de 15 minute. Este colectat supernatantul și este resuspendat peletul în tampon hipotonic și re-omogenizat. Amestecul este centrifugat la 1800 x g timp de 15 minute. Al doilea supernatant este combinat cu primul supernatant. Supernatanții combinați sunt recentrifugați la 1800 x g timp de 15 minute pentru clarificare. Supernatantul clarificat este transferat în tuburi de mare viteză și centrifugat la 25.000 x g timp de 30 de minute la 4°C. Peletul de membrane este resuspendat în tampon de omogenizare și depozitat ca alicote congelate la congelator la -80 °C până la utilizare.

GIP este radioiodinată prin procedura I-125-lactoperoxidazei (Markalonis, J.J., Biochem. J. 113:299 (1969)) și purificată prin HPLC în fază inversă (Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences NEX-402). Activitatea specifică este 2200 Ci/mmol. Determinarea K_D este efectuată prin competiție omoloagă utilizând hGIP rece în loc de legare prin saturație. Testul de legare la receptor este efectuat utilizând un Test de proximitate cu scintilație (SPA) cu perle de aglutinină din germen de grâu (WGA) (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences) blocate anterior cu 1% BSA fără acizi grași (Gibco, 7,5% BSA). Tamponul de legare conține 25 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1% BSA fără acizi grași, 0,003% Tween20, și Inhibitori Roche Complete™ fără

EDTA. hGIP și compușii prezentei invenții se dizolvă în 100% DMSO și se depozitează la -20°C. Compușii sunt diluați serial în tampon de legare. Apoi, 10 μ L de compus diluat sau 100% DMSO se transferă în plăci de testare cu fund clar Corning® 3632 conținând 40 μ L tampon de legare al testului sau GIP rece (NSB la 0,1 μ M final). Apoi, 90 μ L de membrane (3 μ g/godeu), 50 μ L [125 I] GIP (Perkin Elmer Life and Analytical Sciences la 0,15 nM final în reacție), și 50 μ L de perle WGA (150 μ g/godeu) se adaugă, se etanșează, și se amestecă pe un agitator de placă timp de 1 minut. Plăcile sunt citite cu un contor de scintilație MicroBeta® după 12 ore timp de ședere la temperatura camerei.

Rezultatele sunt calculate ca procentaj de legare specifică a I-125-GIP în prezența compusului. Concentrația IC₅₀ absolută este derivată prin regresie neliniară a procentului de legare specifică a I-125-GIP versus concentrația compusului adăugat. Concentrația IC₅₀ este convertită la K_i utilizând ecuația Cheng-Prusoff.

Testul de legare la receptorul GLP-1 utilizează receptorul uman clonat al peptidei 1 asemănătoare glucagonului (hGLP-1R) (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196(1): 141-6, 1993) izolat din membrane de 293HEK. ADNc de hGLP-1R este subclonat în plasmida de expresie pH_D (Trans-activated expression of fully gamma-carboxylated recombinant human protein C, an antithrombotic factor. Grinnell, B.W., Berg, D.T., Walls, J. și Yan, S.B. Bio/Technology 5: 1189-1192, 1987). Acest ADN plasmidic este transfectat în celulele 293HEK și selectat cu 200 μ g/mL Higromicină.

Membranele plasmatice brute sunt preparate utilizând celule din cultura în suspensie. Celulele sunt lizate pe gheață în tampon hipotonic conținând 25 mM Tris HCl, pH 7,5, 1 mM MgCl₂, DNase1, 20 μ /mL, și Inhibitori Roche Complete™ fără EDTA. Suspensia de celule este omogenizată cu un omogenizator Dounce din sticlă utilizând un piston Teflon® timp de 25 de lovături. Omogenatul este centrifugat la 4°C la 1800 x g timp de 15 minute. Este colectat supernatantul și este resuspendat peletul în tampon hipotonic și re-omogenizat. Amestecul este centrifugat la 1800 x g timp de 15 minute. Al doilea supernatant este combinat cu primul supernatant. Supernatanții combinați sunt recentrifugați la 1800 x g timp de 15 minute pentru clarificare. Supernatantul clarificat este transferat în tuburi de mare viteză și centrifugat la 25000 x g timp de 30 de minute la 4°C. Peletul de membrane este resuspendat în tampon de omogenizare și depozitat ca alicote înghețate la congelator la -80 °C până la utilizare.

Peptida 1 asemănătoare glucagonului (GLP-1) este radioiodinată prin procedura I-125-lactoperoxidazei și purificată prin HPLC în fază inversă la Perkin-Elmer Life and Analytical Sciences (NEX308). Activitatea specifică este 2200 Ci/mmol. Determinarea K_D este efectuată prin competiție omoloagă în loc de legare prin saturație din cauza conținutului ridicat de propanol în materialul 1-125 GLP-1. K_D este estimată a fi 0,329 nM și este utilizată pentru a calcula valorile K_i pentru toți compușii testați.

Testul de legare la receptor este efectuat utilizând un Test de proximitate cu scintilație (SPA) cu perle de aglutinină din germen de grâu (WGA) blocate anterior cu 1% BSA fără acizi grași (Gibco). Tamponul de legare conține 25 mM HEPES, pH 7,4, 2,5 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 0,1% BSA fără acizi grași, 0,003% Tween20, și Inhibitori Roche Complete™ fără EDTA. Peptida 1 asemănătoare glucagonului este dizolvată în 100% DMSO la 1 mg/mL și depozitată congelată la -20 °C în alicote de 30 μ L. Alicota de peptidă 1 asemănătoare glucagonului este diluată și utilizată în testele de legare într-o oră. Analogul peptidic este dizolvat în 100% DMSO și diluat serial în 100% DMSO. Apoi, 10 μ L de compuși diluați ai prezentei invenții sau 100% DMSO sunt transferați în plăci de testare cu fund clar Corning® 3632 conținând 40 μ L de tampon de legare al testului sau glucagon rece (NSB la 1 μ M final). Apoi, 90 μ L de membrane (0,5 μ g/godeu), 50 μ L 1-125 Peptidă 1 asemănătoare glucagonului (0,15 nM final în reacție), și 50 μ L de perle WGA (150 μ g/godeu) se adaugă, se etanșează, și se amestecă pe un agitator de placă timp de 1 minut. Plăcile sunt citite cu un contor de scintilație PerkinElmer Life and

Analytical Sciences Trilux MicroBeta® după 12 ore timp de ședere la temperatura camerei.

Rezultatele sunt calculate ca procentaj de legare specifică a I-125-Peptida 1 asemănătoare glucagonului în prezența compușilor. Concentrația IC₅₀ absolută a compusului este derivată prin regresie neliniară a procentului de legare specifică a I-125-Peptida 1 asemănătoare glucagonului versus concentrația compusului adăugat. Concentrația IC₅₀ este convertită la K_i utilizând ecuația Cheng-Prusoff.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, anumiți compuși ai prezentei invenții afișează un raport hGLP-1R/hGIPR de aproximativ 0,5-4,0 (Tabelul 1). Raportul molar de legare este normalizat la raportul molar corespunzător al unui amestec de GIP și GLP-1 native. Acest factor de normalizare este 4,53 pe baza datelor de legare pentru GIP (K_i=0,175 nM) și GLP-1 (K_i=0,793 nM). Valoarea de 1,48 demonstrează activitatea co-agonistă echilibrată din Exemplul 1.

Tabelul 1: Afinitatea de legare la receptor, K_i, nM (SEM, n)

Compus	GIP-R uman	GLP-1R uman	Raport absolut al hGLP-1R/hGIP-R	Raport molar al hGLP-1R/hGIP-R
Exemplul 1	34,4 (5,0, n=8)	232 (40, n=8)	6,7	1,48
GIP, 1-42	0,175 (0,022, n=8)	>175 (n=14)	>1000	
GLP-1, 7-36-NH ₂	>100 (n=15)	0,793 (0,099, n=8)	<0,008	
Exemplul 3	26,7 (2,3, n=17)	427 (33, n=17)	16	3,53
Exemplul 6	44,2 (3,6, n=14)	365 (28, n=14)	8,3	1,83
Exemplul 7	46,1 (5,9, n=11)	352 (39, n=11)	7,6	1,68
Exemplul 8	67,5 (9,9, n=6)	307 (35, n=6)	4,5	0,99
Exemplul 4	40,7 (5,1, n=7)	714 (76, n=7)	17,5	3,86
Exemplul 2	63,9 (11,8, n=8)	344 (60, n=8)	5,4	1,19
Exemplul 5	17,8 (3,0, n=5)	158 (32, n=5)	8,9	1,96

Mediile sunt exprimate ca medii geometrice cu eroarea standard a mediei (SEM) și numărul de replicare (n) indicate în paranteză. Un calificativ (>) indică faptul că datele nu au atins 50% inhibare și K_i este calculată utilizând cea mai mare concentrație testată în test.

Testele funcționale ale hGIP-R, hGLP-1R, și hGCGR.

Activitatea funcțională *in vitro* față de receptorii umani de GIP, GLP-1, și glucagon pentru compușii prezentei invenții este determinată pe liniile celulare clonale HEK-293 care exprimă acești receptori. Fiecare linie celulară care supraexprimă receptorii este tratată cu compușii prezentei invenții în DMEM (Gibco Cat# 31053) suplimentat cu IX GlutaMAX™ (Gibco Cat# 35050), 0,25% FBS, 0,05% fracțiune V BSA, 250 μM IBMX și 20 mM HEPES într-un volum de testare de 40 μl. După o incubare de 60 de minute la temperatura camerei, creșterea rezultată în AMPc intracelular este determinată cantitativ utilizând Trusa de testare CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (Bedford, MA). Pe scurt, nivelurile de AMPc în celulă sunt detectate prin adăugarea de conjugat AMPc-d2 în tamponul de lizare celulară (20 μl) urmat de anticorpii anti-AMPc-Eu³⁺-Cryptate, de asemenea în tamponul de lizare celulară (20 μl). Testul competitiv rezultat este incubat timp de cel puțin 60 de minute la temperatura camerei, apoi se detectează utilizând un instrument PerkinElmer Envision® cu excitație la 320 nm și emisie la 665 nm și 620 nm. Unitățile Envision (emisie la 665nm/620nm*10.000) sunt invers proporționale cu

cantitatea de AMPc prezentă și sunt convertite la nM AMPc per godeu utilizând o curbă standard a AMPc. Cantitatea de AMPc generată (nM) în fiecare godeu este convertită la un procent din răspunsul maxim observat cu oricare dintre controalele GIP(1-42)NH₂ uman, GLP-1(7-36)NH₂ uman, sau glucagon uman. O valoare relativă a EC₅₀ și procentul de top (E_{max}) sunt derivate prin analiza regresiei neliniare utilizând procentul de răspuns maxim versus concentrația compusului din prezenta invenției, încadrate la o ecuație logistică cu patru parametri.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, anumiți compuși ai prezentei invenții demonstrează activitate împotriva receptorilor umani de GIP și GLP-1, în timp ce demonstrează de asemenea selectivitate față de receptorul glucagonului. În Tabelul 2, potența funcțională împotriva receptorilor este prezentată pentru controalele native de hGIP(1-42)NH₂, hGLP-1(7-36)NH₂, și hGlucagon, și anumiți compuși ai prezentei invenții.

Tabelul 2. Potența funcțională (EC₅₀) împotriva receptorilor umani de GIP, GLP-1, și glucagon.

Compus	GIP-R uman		GLP-1R uman		GCGR uman	
	EC ₅₀ , nM±SEM (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , nM±SEM (n)	E _{max} , %	EC ₅₀ , nM±SEM, (n)	E _{max} , %
Exemplul 1	11,0±0,9 (17)	97,9±3,0	71,2±7,2 (17)	85,2±4,4	>1000(13)	ND
Exemplul 3	3,15±0,34 (14)	106±3	33,9±3,2 (14)	96,2±6,2	>1000 (10)	ND
Exemplul 6	4,40±0,71 (13)	106±3	28,4±4,2 (13)	104±4	>1000 (9)	ND
Exemplul 7	8,07±0,70 (17)	106±3	35,5±2,6 (17)	97,2±3,4	>1000 (13)	ND
Exemplul 8	21,1±2,7 (14)	108±4	57,9±6,8 (13)	88,4±2,3	>1000 (10)	ND
Exemplul 4	3,76±0,83 (6)	102±3	66,9±14,9 (6)	100±5	>1000 (2)	ND
Exemplul 2	17,5±2,0 (13)	94,7±2,0	75,7±6,0 (13)	98,2±5,5	>1000 (9)	ND
Exemplul 5	8,76±0,86 (10)	105±2	70,9±9,7 (10)	105±4	>1000 (10)	ND
hGLP-1(7-36)NH ₂			0,176 ±0,015 (17)	102±2		
hGIP(1-42)NH ₂	0,135 ±0,010 (17)	100±1				
hGlucagon					0,0208 ±0,0024 (13)	115±2

Mediile pentru EC₅₀ sunt exprimate ca medii geometrice +/- eroarea standard a mediei (SEM) cu numărul de replicare (n) indicat în paranteză. Mediile pentru E_{max} sunt exprimate ca medie aritmetică +/- eroare standard. ND semnifică faptul că nu a fost detectată activitate agonistă. Un calificativ (>) indică faptul că o EC₅₀ nu a putut fi determinată. Toate valorile prezentate sunt la trei cifre semnificative

Activarea funcțională a celulelor cu hGIP-R pentru a genera AMPc intracelular la liniile celulare care secretă incretine

Activitatea funcțională a hGIP-R pentru compușii prezentei invenții s-a demonstrat prin abilitatea compușilor de a genera AMPc intracelular în celulele GLUTag, o linie celulară enteroendocrină murină relativ diferențiată imortalizată stabilă care exprimă gena de proglucagon și secretă peptide asemănătoare glucagonului într-o manieră regulată. Celulele sunt menținute la 37°C, 5% CO₂, 95% umiditate în mediu DMEM suplimentat cu 5,5 mM glucoză, 10% FBS, și 2 mM glutamină. Înainte de testare, celulele sunt tripsinizate, peletate, și însămânțate în plăci de testare pentru culturi de țesut cu 96 de godeuri la o densitate de 20.000 de celule/godeu. Celulele sunt lăsate să se atașeze și sunt incubate timp de 48 de ore la 37°C, 5% CO₂. În ziua testului, mediul este decantat

din celule și 50 μ l de Tampon EBSS (0,1% BSA, 2 mM glucoză și 0,25 mM IBMX) conținând un interval de concentrații ale compusului (0,001 - 3 μ M) se adaugă la celule. Placa este incubată la 37°C timp de o oră și sunt determinate nivelurile de AMPc utilizând trusa Cisbio Dynamic 2 cAMP HTRF (Bedford, MA). 25 μ l de anti-AMPc-criptat și 25 μ l AMPc-d2 se adaugă la fiecare godeu și sunt incubate plăcile timp de o oră la temperatura camerei. Plăcile sunt citite la 620nm și 665nm pe un Tecan Genios Pro. Rezultatele sunt calculate din raportul 665nm/620nm multiplicat cu 10000, și convertit la nM AMPc per godeu utilizând o curbă standard a AMPc. Datele sunt analizate cu GraphPad utilizând un algoritm logistic neliniar cu 4 parametri.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, anumiți compuși ai prezentei invenții prezintă o acumulare crescută de AMPc, dependentă de doză în celulele GLUTag (Tabelul 3). Controlul de GLP-1 nativă nu reușește să inducă nici o modificare a AMPc la toate concentrațiile testate și indică faptul că acest sistem celular exprimă exclusiv receptorul de GIP; prin urmare, se poate demonstra că anumiți compuși ai prezentei invenții exercită un efect prin receptorul de GIP.

Tabelul 3: EC₅₀ în celulele GLUTag.

Compus	Media EC ₅₀ , nM (n)
Exemplul 3	1610 (1)
Exemplul 7	2746 (1)
Exemplul 4	2186 (1)
Exemplul 2	2918 (1)
Exemplul 1	1494 (2)
GIP nativă	11,62 (3)

Măsurarea AMPc intracelular din celulele HEK293 care exprimă tranzitoriu receptorul uman de GLP-2

Activitatea funcțională a hGLP-2R în prezența compușilor din prezenta invenție este demonstrată prin măsurarea AMPc intracelular din celulele HEK293. Aceste celule sunt pasate în mediu complet, transfectate în suspensie cu reactiv Promega Eugene6 și ADNc de GLP-2R cu lungime completă uman în vectorul de expresie pcDNA3.1, și lăsate să adere la flacoanele pentru cultură tisulară într-un mediu umidificat de 37°C 5% CO₂. După aproximativ 48 de ore de propagare, celulele sunt desprinse, întinse, și crioconservate cu o rată controlată de congelare și 10% DMSO ca crioprotector. În testele ulterioare, este dezghețată o singură fiolă gata de testare din aceeași congelare celulară pentru a minimiza variația între teste. În ziua testului celular, mediul de congelare este schimbat cu Invitrogen 31053 DMEM conținând 0,5% FBS.

Celulele sunt numărate pentru viabilitate și echilibrate timp de aproximativ una până la două ore la 37°C înainte de tratament. Compușii prezentei invenții sunt solubili în DMSO și diluați imediat în mediu DMEM conținând 0,1% fracțiune V BSA și inhibitorul ne-specific al fosfodiesterazei, IBMX. Durata tratamentului este de 30 de minute la 37°C. Concentrația finală a DMSO nu depășește 1,1%, și concentrația finală a IBMX este de 250 μ M. AMP ciclic este măsurat utilizând testul dinamic 2 cu tehnologia fluorescenței omogene rezolvate în timp (Cisbio Bioassays, Bedford, MA). Concentrațiile respective de AMPc sunt deduse din metoda raportului de calculare și standardele externe. Răspunsurile sigmoideale la doză ale compușilor testați sunt examinate utilizând ecuația logistică cu patru parametri și comparate cu ligandul C₁₈-acilat nativ.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, controlul de GLP-2 uman acilat la C₁₈ are o valoare a EC₅₀ pentru activarea receptorului de 1,71 nM în timp ce anumiți compuși ai prezentei invenții au valori ale EC₅₀ de la aproximativ

100x până la 1000x mai ridicate. Valorile EC₅₀ pentru anumiți compuși ai prezentei invenții demonstrează selectivitate împotriva receptorului de GLP-2.

Tabelul 4: Măsurarea activității funcționale a GLP-2R în celulele HEK293.

Compus	Rel EC ₅₀ (nM)	n
GLP2-C ₁₈ -diacid	1,857	4
Exemplul 3	199,3	4
Exemplul 7	1,800	4
Exemplul 4	405	2
Exemplul 1	238	4
Exemplul 2	1612	2

Secreția de insulină insulară la rozătoare

Pentru a evalua acțiunea compușilor din prezenta invenție într-un sistem reprezentând nivelurile fiziologice ale expresiei de GLP-1R și GIP-R de secreție de insulină, compușii sunt testați pentru efectele asupra secreției de insulină din insulele rozătoarelor de tip sălbatic.

După canularea canalului biliar comun la șoarecii C57B1/6 masculi (22-26 g) sau șobolanii Sprague-Dawley masculi (aprox. 250 g), pancreasul este destins cu tampon Hank (3 ml pentru șoareci sau 10 ml pentru șobolani), conținând 2% BSA și 0,75 mg/ml collagenază Clzyme (VitaCyte). Ulterior, țesuturile sunt digerate în tampon Hank la 37°C timp de 11-13 minute (șoareci) sau 14-16 minute pentru pancreasul de șobolan. Insulele purificate (gradient Histopaque-1100 [Sigma-Aldrich], 18 min la 750x gravitație) sunt cultivate peste noapte în mediu RPMI-1640 (Invitrogen) conținând 10% FBS, 100 U/ml penicilină și 100 μg/ml streptomycină, și preconditionate prin înfometare în Soluție salină echilibrată Earle (EBSS) suplimentată cu 0,1% BSA și 2,8 mM glucoză. Ulterior, insulele sunt incubate în EBSS (Invitrogen) suplimentată cu 0,1% BSA, 2,8-11,2 mM glucoză și niveluri crescătoare de compus (6 loturi de 4 insule/afecțiune). GLP-1(7-36)amidă (30 nM) este utilizată ca control pozitiv. Insulina este măsurată peste 90 de minute în supernatant utilizând Testul de insulină MSD (Meso Scale, Gaithersburg, MD).

Anumiți compuși ai prezentei invenții cresc dependent de doză secreția de insulină atât din insulele de șobolan cât și de șoarece așa cum s-a reprezentat în Tabelul 5.

Tabelul 5. Secreția de insulină insulară la rozătoare

Secreția de insulină insulară la șobolan		
Compus	Media ED ₅₀ (nM)	N
Exemplul 3	34,9	2
Exemplul 1	15,5	3
Secreția de insulină insulară la șoarece		
Compus	Media ED ₅₀ (nM)	N
Exemplul 3	58,9	2
Exemplul 6	51,4	1
Exemplul 7	11,3	1
Exemplul 4	3,5	1
Exemplul 2	30,0	1

Secreția de insulină insulară la șoarece		
Compus	Media ED50 (nM)	N
Exemplul 1	47,2	2

Profilarea imunogenității

Riscul de imunogenitate pentru compușii prezentei invenții este evaluat utilizând programe de predicție *in silico*, cum ar fi analiza *in silico* Epivax. Riscul de imunogenitate pentru compușii prezentei invenții este evaluat de asemenea printr-o metodă *ex-vivo* pentru a măsura răspunsurile celulelor T cultivate (absorbția de ³H-timidină și secreția citokinei IL-2) în prezența compușilor din prezenta invenție.

Cu uneltele imuno-informatică Epivax este efectuată o evaluare *in silico* asupra compușilor prezentei invenții pentru a prezice un răspuns imun după administrare. Analiza utilizează probabilitatea unui cadru de 9-mer de a se lega la o alelă dată de antigen leucocitar uman (HLA) și apoi detecția acestor Epi-Bare. Pentru Exemplul 1, un scor EpiMatrix de aproximativ +1,13 indică un potențial mult mai scăzut de a induce un răspuns imun în comparație cu structura principală a peptidei GIP native cu un scor EpiMatrix de + 15,4. Un Exemplu de co-agoniști GIP / GLP-1 din WO 2011/119657 a avut un scor de + 29,5.

O măsură a imunogenității clinice prezise este de asemenea examinată pentru compușii prezentei invenții utilizând caracterizarea proliferării celulelor T CD4+ și secreția de citokină IL-2 într-o cohortă de 50 de donatori sănătoși reprezentativi ai populației globale de alotip HLA. Anumiți compuși ai prezentei invenții demonstrează un grad de stimulare a celulelor T și secreție de IL-2 după expunere care nu depășește pragul asociat cu compușii imunogeni cunoscuți sau pozitivi, care indică un risc scăzut de producere a imunogenității clinice.

Farmacocinetică

Farmacocinetica la maimuțele *Cynomolgus*.

Proprietățile farmacocinetice *in vivo* pentru compușii prezentei invenții sunt demonstrate utilizând maimuțe *Cynomolgus*. Compușii sunt administrați printr-o singură doză intravenoasă sau subcutanată (0,2 mg/kg) în 20 mM tampon de citrat (pH 7,0) la un volum de 0,21 ml/kg. Sângele este colectat de la fiecare animal la 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 204, 240, și 312 ore după dozaj. Concentrațiile plasmatice ale compușilor din prezenta invenție sunt determinate printr-o metodă LC/MS. Pe scurt, un compus din prezenta invenție este extras din 100% mostră plasmatică de maimuță (50 μl) diluată cu IX PBS (150 μl) și amestecată cu N-butanol (400 μl). Sunt formate trei straturi distincte de lichid cu compusul situat în stratul superior. Un volum de 200 μl este transferat într-o placă cu 96 de godeuri cu fund în v, uscat utilizând Azot gazos încălzit și reconstituit cu 100 μl de 30% acetonitril/ 0,1% acid formic. Sunt injectați 20 μl din mostra reconstituită într-o coloană Supelco Analytical Discovery bio wide C5 3 μm. Efluentul coloanei este direcționat într-un spectrometru de masă Thermo Q-Exactive pentru detecție și cuantificare.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris pentru acest test, Exemplul 1 a atins o concentrație plasmatică maximă medie la aproximativ 8 ore după doza subcutanată. Media perioadei de înjumătățire este de 55 de ore și media clearance-ului este de 0,73 mL/oră/kg. Biodisponibilitatea este de aproximativ 83%. Aceste date susțin potențialul dozării de o dată pe săptămână pentru Exemplul 1. Datele pentru alți compuși ai prezentei invenții sunt rezumate în Tabelul 6.

Tabelul 6: Parametrii farmacocinetici medii după o singură doză subcutanată de 0,2 mg/kg la masculii maimuțelor Cynomolgus

Compus	Media $T_{1/2}$ (ore)	Media Tmax (ore)	Media Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	Media $\text{AUC}_{0-\infty}$ (ore $\cdot\mu\text{g/mL}$)	Media CL/F (mL/oră/kg)
Exemplul 3	34	8	3,0	153	1,3
Exemplul 7	31	6	2,9	136	1,5
Exemplul 6	23	4	2,2	72,3	2,8
Exemplul 8	23	10	1,0	42,8	4,7
Exemplul 2	43	24	2,1	173	1,2
n = 2, $\text{AUC}_{0-\infty}$ = aria de sub curbă de la 0 la infinit, CL/F = clearance / biodisponibilitate, Tmax = timp până la concentrația maximă, Cmax = concentrația plasmatică maximă, $T_{1/2}$ = perioada de înjumătățire.					

Proiecția potenței dozei

Testul de toleranță la glucoză intravenoasă (ivGTT) la șobolan este utilizat pentru a estima potența relativă a compușilor din prezenta invenție în comparație cu semaglutida. Doze subcutanate (SC) singulare de 0,1-10 nmoli/kg din fiecare compus sunt administrate la șobolani și un ivGTT este administrat la fiecare șobolan la 16 ore după dozaj. Este măsurată expunerea la momentul ivGTT, și pentru modelarea răspunsului la expunere, este utilizată AUC a insulinei ca răspuns la ivGTT ca obiectiv principal.

Un model de $E_{\max}$ este utilizat pentru a compara profilurile răspunsului la expunere pentru Exemplul 1 la semaglutidă. În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris pentru acest test, expunerea este în mod esențial aceeași pentru Exemplul 1 și semaglutidă pentru nivelurile de doză care au avut niveluri de medicament peste limita de cuantificare a testului. Ambele seturi de date sunt încadrate simultan și valorile E_0 și $E_{\max}$ sunt constrânse să fie aceleași pentru ambii compuși. Numai valorile ED_{50} sunt încadrate separat pentru compuși. Valoarea ED_{50} pentru semaglutidă este estimată ca 0,6 +/- 0,2 nmoli/kg. Potența din Exemplul 1 este estimată ca potență relativă la semaglutidă, și este de 1,7 +/- 0,6 ori potența semaglutidei. Ajustând diferențele de CL/F (clearance aparent) între cele două molecule la maimuțe și de asemenea diferența de masă moleculară, doza echivalentă umană medie proiectată la 1 mg semaglutidă este de aproximativ 1,3 mg/săptămână pentru Exemplul 1.

Diabetul de tip 2**Secreția de insulină in vivo la șobolan după glucoza intravenoasă (IVGTT)**

Șobolanii Wistar masculi (Harlan Labs, Indianapolis, IN) sunt randomizați după masa corporală și dozați cu 1,5 ml/kg s.c. cu 16 ore înainte de administrarea glucozei și apoi înfometați. Dozele sunt vehicul, 0,1, 0,3, 1, 3 și 10 nmoli/kg. Animalele sunt cântărite, și apoi anesteziate cu pentobarbital de sodiu (soluție de Nembutal Sodium; Ovation Pharmaceuticals) dozat i.p. (65 mg/kg, 30 mg/ml). Este colectată o mostră de sânge de timp zero în tuburi cu EDTA după care este administrată glucoza (0,5 mg/kg, 5 ml/kg). Sunt colectate probe de sânge la 2, 4, 6, 10, 20, și 30 de minute după glucoză. Nivelurile glucozei plasmatice sunt determinate utilizând un analizor Hitachi (Roche) și insulina plasmatică este măsurată prin testul de insulină MSD (Meso Scale, Gaithersburg, MD).

Așa cum se arată în Tabelul 7, anumiți compuși ai prezentei invenții amplifică dependent de doză secreția de insulină după injecția i.v. de glucoză. ED₅₀ pentru insulină și creșterile maxime ale secreției de insulină (măsurate ca arie sub curba de insulină) sunt date în Tabelul 7.

Tabelul 7. Amplificarea secreției de insulină în testul IVGTT la șobolan

Compus	ED ₅₀ (nmoli/kg)	% max de creștere a AUC de insulină
Exemplul 3	1,00	314+/- 38%
Exemplul 3	1,42	219 +/- 19%
Exemplul 6	2,58	289 +/- 4%
Exemplul 7	4,33	335 +/- 35%
Exemplul 7	1,10	278 +/- 26%
Exemplul 8	6,13	324 +/- 30%
semaglutidă	0,70	231 +/- 13%
Exemplul 2	1,62	233 +/- 19%
Exemplul 1	0,87	298 +/- 17%
Exemplul 5	1,02	349 +/- 39%

Efectul asupra pierderii în greutate, compoziției corpului și steatozei hepatice la șoarecii cu obezitate indusă prin dietă (DIO)

Efectele asupra pierderii în greutate, compoziției corporale și steatozei hepatice la șoarecii cu DIO pentru compușii prezentei invenții sunt evaluate la șoarecii cu DIO C57/BL6. Aceste animale, deși nediabetice, afișează rezistență la insulină, dislipidemie, și steatoză hepatică, care sunt toate caracteristici ale sindromului metabolic, după ce au fost plasate pe o dietă bogată în grăsimi (60% Kcal din grăsimi) timp de 12 săptămâni.

În acest studiu, sunt utilizați șoareci C57/B16 cu obezitate indusă prin dietă (DIO) masculi în vârstă de 23-24 de săptămâni, fiecare cântărind 41-49 g și având o masă inițială de grăsime care variază de la 10,5-17,5 g. Animalele sunt găzduite individual într-un adăpost cu temperatură controlată (24°C) cu un ciclu de lumină/întuneric de 12 ore (luminile se aprind la 22:00), și acces liber la hrană și apă. După 2 săptămâni de aclimatizare cu adăpostul, șoarecii sunt randomizați în grupuri de tratament (n=5/grup) pe baza masei corporale astfel încât fiecare grup să aibă o masă corporală medie de început similară.

Controlul cu vehicul, compușii prezentei invenții (cu doza variind de la 10 până la 100 nmoli/kg), sau un analog al GLP1 care acționează îndelungat semaglutida (30 nmoli/kg), dizolvați în vehicul (20 mM Tampon de citrat la pH 7,0), sunt administrați prin injecție SC la șoarecii cu DIO hrăniți *ad libitum* cu 30-90 de minute înainte de debutul ciclului de întuneric la fiecare trei zile timp de 15 zile. Injecțiile SC sunt făcute în Ziua 1, 4, 7, 10, și 13. Masa corporală zilnică și aportul alimentar sunt măsurate pe parcursul studiului. Modificările absolute ale masei corporale sunt calculate scăzând masa corporală a aceluiași animal înainte de prima injecție cu compusul. În zilele 0 și 14, masa totală de grăsime este măsurată prin rezonanță magnetică nucleară (RMN) utilizând un instrument Echo Medical System (Houston, TX).

În Ziua 15, glucoza din sânge este măsurată cu glucometrul Accu-Chek (Roche) din sângele venei cozii și apoi animalele pot fi sacrificate și ficatul îndepărtat și congelat. Trigliceridele hepatice, determinate din omogenatele de ficat colectat la sacrificare, și colesterolul plasmatic sunt măsurate pe un analizor clinic Hitachi Modular P. Comparațiile statistice între grupuri sunt făcute utilizând ANOVA unifactorială urmată de testul de comparație multiplă Dunnett. ED₅₀ pentru reducerea pierderii în greutate este determinată în GraphPad Prism utilizând unealta de încadrare neliniară.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, anumiți compuși ai prezentei invenții au redus masa corporală și masa de grăsime într-o manieră dependentă de doză (Tabelul 8-13), și în comparație cu semaglutida, pot fi de 3-5x mai eficace în scăderea masei corporale. ED₅₀ din Exemplul 1 în procent de pierdere a masei corporale este 5,422 nmoli/kg (niveluri ale Intervalului de încredere de 95% [nmoli/kg] = 2,2 până la 13,6). Masa corporală redusă s-a descoperit ca fiind datorată în primul rând reducerii masei de grăsime.

Tabelul 8. Procentul de modificare a masei corporale sau a masei de grăsime la șoarecii cu DIO.

Tratament	Doză (nmoli/kg)	% Modificare din masa corporală inițială	% Modificare din masa de grăsime inițială
Control	0	-3,14 ± 0,88	-4,84 ± 1,79
Semaglutidă	10	-12,36 ± 1,00****	-18,21 ± 2,24**
Semaglutidă	30	-14,20 ± 1,01****	-21,90 ± 2,07***
Semaglutidă	100	-19,30 ± 1,38****	-33,51 ± 3,30***
Exemplul 3	10	-13,38 ± 0,88****	-20,76 ± 2,42***
Exemplul 3	30	-18,13 ± 1,44****	-30,90 ± 2,06****
Exemplul 3	100	-25,84 ± 1,93****	-45,92 ± 2,15****
Exemplul 6	10	-15,31 ± 1,25****	-24,75 ± 1,89****
Exemplul 6	30	-21,62 ± 0,92****	-36,30 ± 2,47****
Exemplul 6	100	-33,95 ± 1,93****	-64,64 ± 4,04****

p<0,01, *p<0,001, ****p<0,0001 din grupul de control (ANOVA unifactorială, Dunnett). Rezultatele sunt exprimate ca Medie ± SEM de 5 șoareci per grup.

Tabelul 9. Procentul de modificare a masei corporale sau a masei de grăsime la șoarecii cu DIO.

Tratament	Doză (nmoli/kg)	% Modificare din masa corporală inițială	% Modificare din masa de grăsime inițială
Control	0	-0,74 ± 1,49	3,04 ± 3,65
Semaglutidă	30	-17,03 ± 0,98****	-35,94 ± 4,09****
Exemplul 2	10	-23,27 ± 1,72****	-49,89 ± 5,62****
Exemplul 2	30	33,07 ± 1,65****	-72,80 ± 4,04****
Exemplul 2	100	-34,66 ± 1,80****	-76,20 ± 3,78****
Exemplul 5	10	-23,42 ± 1,43****	-51,28 ± 1,89****
Exemplul 5	30	-26,84 ± 3,14****	-62,77 ± 5,49****
Exemplul 5	100	-37,86 ± 2,25****	-81,08 ± 1,68****
Exemplul 1	10	-25,18 ± 1,82****	-50,98 ± 2,87****
Exemplul 1	30	-26,58 ± 2,49****	-59,98 ± 6,60****
Exemplul 1	100	-38,14 ± 1,67****	-79,79 ± 3,10****

****p<0,0001 din grupul de control (ANOVA unifactorială, Dunnett). Rezultatele sunt exprimate ca Medie ± SEM de 5 șoareci per grup.

Tabelul 10. Procentul de modificare a masei corporale sau a masei de grăsime la șoarecii cu DIO.

Tratament	Doză (nmoli/kg)	% Modificare din masa corporală inițială	% Modificare din masa de grăsime inițială
Control	0	-2,43 ± 2,06	-1,49 ± 3,69

Tratament	Doză (nmoli/kg)	% Modificare din masa corporală inițială	% Modificare din masa de grăsime inițială
Exemplul 6	10	-17,54 ± 1,17****	-34,30 ± 1,20****
Exemplul 6	30	-19,52 ± 1,18****	-39,52 ± 3,18****
Exemplul 6	100	-29,36 ± 2,62****	-56,66 ± 4,96****
Exemplul 7	10	-15,08 ± 1,22****	-26,46 ± 2,31***
Exemplul 7	30	-20,70 ± 1,95****	-43,49 ± 5,47****
Exemplul 7	100	-24,36 ± 2,06****	-49,92 ± 3,40****
Exemplul 8	10	-17,13 ± 0,81****	-34,20 ± 1,62****
Exemplul 8	30	-25,27 ± 0,70****	-54,24 ± 2,35****
Exemplul 8	100	-29,91 ± 2,03****	-65,23 ± 6,69****

****p<0,001 din grupul de control (ANOVA unifactorială, Dunnett). Rezultatele sunt exprimate ca Medie ± SEM de 5 șoareci per grup.

Tabelul 11. Glucoza sanguină, colesterolul plasmatic și trigliceridele plasmatice la șoarecii cu DIO.

Tratament	Doză (nmoli/kg)	Glucoză sanguină (mg/dl)	Colesterol plasmatic (mg/dl)	Trigliceride plasmatice (mg/dl)
Control	0	141,6 ± 5,59	303,2 ± 13,97	54,2 ± 11,14
Semaglutidă	10	147,6 ± 6,13	226,8 ± 13,86**	27,36 ± 3,56*
Semaglutidă	30	146,8 ± 8,43	229,8 ± 10,96**	27,9 ± 6,01*
Semaglutidă	100	134,3 ± 9,22	218,4 ± 18,70**	36,46 ± 5,34
Exemplul 3	10	109,5 ± 2,35***	213,2 ± 15,54***	30,38 ± 8,23
Exemplul 3	30	107,6 ± 1,32***	177,4 ± 16,58****	21,32 ± 2,48**
Exemplul 3	100	102,00 ± 0,50****	194,00 ± 14,40***	20,55 ± 4,60**
Exemplul 6	10	105,8 ± 2,10***	198,4 ± 6,76****	20,78 ± 4,40**
Exemplul 6	30	100,1 ± 3,29****	186,4 ± 17,04****	26,12 ± 6,85*
Exemplul 6	100	103,6 ± 3,20****	151,4 ± 14,32****	17,26 ± 1,67***

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 din grupul de control (ANOVA unifactorială, Dunnett). Rezultatele sunt exprimate ca Medie ± SEM de 5 șoareci per grup.

Tabelul 12. Glucoza sanguină, colesterolul plasmatic și trigliceridele hepatice la șoarecii cu DIO.

Tratament	Doză (nmoli/kg)	Glucoză sanguină (mg/dl)	Colesterol plasmatic (mg/dl)	Trigliceride hepatice (mg/g de țesut)
Control	0	144,30 ± 8,16	233,6 ± 12,99	206,65 ± 29,47
Semaglutidă	30	136,3 ± 3,81	161,0 ± 13,92***	67,63 ± 23,40****
Exemplul 2	10	110,8 ± 3,87**	121,8 ± 13,64****	60,77 ± 13,24****
Exemplul 2	30	110,8 ± 3,20**	114,00 ± 9,70****	65,78 ± 17,07****
Exemplul 2	100	113,2 ± 4,86**	109,4 ± 8,83****	56,74 ± 17,76****
Exemplul 5	10	111,00 ± 6,56**	126,6 ± 9,67****	48,30 ± 8,14****
Exemplul 5	30	104,5 ± 5,30***	108,2 ± 13,84****	39,60 ± 4,71****
Exemplul 5	100	105,3 ± 6,16***	108,6 ± 4,83****	67,96 ± 13,53****
Exemplul 1	10	102,3 ± 5,59****	120,6 ± 8,55****	60,74 ± 5,33****
Exemplul 1	30	110,7 ± 5,85**	118,2 ± 10,11****	45,24 ± 5,87****

Tratament	Doză (nmoli/kg)	Glucoză sanguină (mg/dl)	Colesterol plasmatic (mg/dl)	Trigliceride hepatice (mg/g de țesut)
Exemplul 1	100	106,7 ± 7,33***	107,6 ± 10,43****	66,98 ± 17,29****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 din grupul de control (ANOVA unifactorială, Dunnett). Rezultatele sunt exprimate ca Medie ± SEM de 5 șoareci per grup.

Tabelul 13. Glucoza sanguină și colesterolul plasmatic la șoarecii cu DIO.

Tratament	Doză (nmoli/kg)	Glucoză sanguină (mg/dl)	Colesterol plasmatic (mg/dl)
Control	0	152,4 ± 3,63	243,6 ± 13,12
Exemplul 6	10	121,4 ± 2,74***	167,8 ± 15,59****
Exemplul 6	30	121,9 ± 6,65**	159,8 ± 9,99****
Exemplul 6	100	116,1 ± 4,67****	144,2 ± 7,12****
Exemplul 7	10	113,6 ± 4,16****	161,8 ± 6,2****
Exemplul 7	30	114,7 ± 4,70****	153,6 ± 13,47****
Exemplul 7	100	114 ± 2,36****	145,4 ± 9,48****
Exemplul 8	10	114,7 ± 4,61****	158,8 ± 7,57****
Exemplul 8	30	117,1 ± 8,26***	139,4 ± 6,83****
Exemplul 8	100	125,4 ± 6,30**	127,8 ± 6,34****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 din grupul de control (ANOVA unifactorială, Dunnett). Rezultatele sunt exprimate ca Medie ± SEM de 5 șoareci per grup.

Efectul asupra metabolismului energetic la șoarecii cu DIO

Efectele asupra metabolismului energetic la șoarecii cu DIO pentru compușii prezentei invenții sunt evaluate la șoarecii masculi cu DIO C57/B16 în vârstă de 26 de săptămâni, care cântăresc 43-50 g. Șoarecii sunt găzduiți individual într-un adăpost cu temperatură controlată (24°C) cu un ciclu de lumină/întuneric de 12 ore (luminile se aprind la 22:00), și cu acces liber la hrană TD95217 (Teklad) și apă. După 2 săptămâni de aclimatizare cu adăpostul, șoarecii sunt randomizați în grupuri de tratament (n=6/grup) pe baza masei corporale astfel încât fiecare grup să aibă o masă corporală medie de început similară. Animalele sunt plasate într-un calorimetru PhenoMaster/LabMaster (TSE Systems, Chesterfield, MO) timp de 3 zile pentru aclimatizare. Controlul cu vehicul (20 mM tampon de citrat la pH 7,0, 10 ml/kg), compușii prezentei invenții, sau un analog al GLP1 care acționează îndelungat, semaglutida, (30 nmoli/kg) sunt administrați subcutanat la șoarecii cu DIO hrăniți *ad libitum* cu 30-90 de minute înainte de debutul ciclului de întuneric la fiecare trei zile timp de 22 de zile. Căldura și coeficientul respirator (RER) sunt măsurate prin calorimetrie indirectă cum s-a descris utilizând un sistem de calorimetrie cu circuit deschis. RER este raportul volumului de CO₂ produs (Vco₂) la volumul de O₂ consumat (Vo₂). Căldura este calculată cu masa corporală totală considerată:

$$VO_2 = \text{FluxML} \cdot (V_1 + V_2) / N_2 \text{Ref} \cdot \text{Masa animalului} \cdot 100)$$

$$VCO_2 = \text{FluxML} \cdot dCO_2 / \text{Masa animalului} \cdot 100)$$

$$\text{Căldură} = (CVO_2 \cdot VO_2 + CVCO_2 \cdot VCO_2) / 1000;$$

$$\text{unde } CVO_2 = 3,941; CVCO_2 = 1,106$$

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, șoarecii tratați cu Exemplul 1 și-au crescut semnificativ rata metabolică cu 10 până la 15 % în comparație cu grupul de control, începând din săptămâna 2, și au menținut efectul pe tot parcursul perioadei de tratament. Semaglutida, în schimb, nu a avut efect asupra ratei metabolice. Creșterea ratei metabolice pentru Exemplul 1 reprezintă parțial pierderea în greutate suplimentară observată cu tratamentul din Exemplul 1 în comparație cu tratamentul cu semaglutidă.

Efectul asupra golirii gastrice la șoarecii cu DIO

Efectele asupra golirii gastrice la șoarecii cu DIO pentru compușii prezentei invenții sunt evaluate la șoarecii masculi cu obezitate indusă prin dietă (DIO) în vârstă de 23 de săptămâni (Harlan). Șoarecii sunt înfometați timp de 16-17 ore. În timpul începerii perioadei de repaus alimentar șoarecii sunt dozați subcutanat cu control cu vehicul (20 mM tampon de citrat la pH 7,0); doze crescătoare de compuși ai prezentei invenții (3, 10, 30 și 100 nmoli/kg), sau un analog al GLP1 care acționează îndelungat, semaglutida, (30 nmoli/kg). Ziua următoare, șoarecilor le sunt administrați 0,5 ml (0,5 grame) de dietă semi-lichidă proaspăt preparată (la 2 minute distanță) prin gavaj oral. Apa este îndepărtată în acest moment pentru a preveni diluția dietei administrate. La două ore după administrarea dietei, șoarecii sunt eutanasiați la două minute distanță cu gaz de CO₂. Stomacul este îndepărtat în timp ce sunt prinse cu cleme ambele deschideri cardiacă și pilorică, apoi clemele sunt îndepărtate și este cântărit întregul stomac într-o barcă de cântărire. Stomacul este apoi incizat și este îndepărtat conținutul. Este spălat și uscat stomacul și re-cântărit pentru a evalua conținutul alimentar din stomac. % de golire gastrică este egal cu $100 \times (1 - (\text{hrana rămasă în stomac} / \text{hrana administrată oral}))$.

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris în acest test, Exemplul 1 a încetinit rata de golire gastrică a dietei semi-lichide într-o manieră dependentă de doză. Inhibarea maximă a golirii gastrice a fost observată la o doză de 10 nmoli/kg +/- doză (Tabelul 14).

Tabelul 14. Golirea gastrică a unei diete semi-lichide la șoarecii cu DIO C57/BL6 slabi.

<i>Tratament</i>	<i>Doză (nmoli/kg)</i>	<i>Procent de golire gastrică (Medie ± SEM)</i>
Vehicul (n=5)	0	69,50 +/- 6,60
Semaglutidă (n=5)	30	30,56 +/- 7,53**
Exemplul 1 (n=4)	3	49,11 +/- 8,52
Exemplul 1 (n=5)	10	9,76 +/- 7,69****
Exemplul 1 (n=5)	30	26,53 +/- 8,14**
Exemplul 1 (n=5)	100	18,45 +/- 6,87***
Comparațiile statistice între grupuri sunt făcute utilizând ANOVA unifactorială urmată de Testul de comparație multiplă Dunnett. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001 din grupul de control. Rezultatele sunt exprimate ca medie +/- SEM de 4-5 șoareci per grup.		

Măsurătorile corticosteronului plasmatic la șobolanii Sprague Dawley

Așa cum s-a sugerat în anumite studii publicate, nivelurile ridicate de corticosteron plasmatic sunt un indicator al posibilei tolerabilități reduse pentru analogii de GIP și GLP-1. Nivelurile de corticosteron plasmatic sunt evaluate utilizând Șobolani Sprague Dawley

(Harlan, Indianapolis), cântărind aproximativ 220 g și aclimatizați timp de cel puțin 72 de ore înainte de manipulare. Șobolanii sunt apoi dozați cu vehicul (20 mM tampon de citrat, pH 7), semaglutidă (10 nmoli/kg), sau compuşii prezentei invenții la 3, 10 sau 30 nmoli/kg s.c. cu 8 șobolani per grup de dozare. Șobolanii sunt decapitați 16 ore mai târziu. Sângele este colectat în tuburi cu EDTA pe gheață, apoi centrifugat 5 minute la 8000 RPM într-o centrifugă Eppendorf 5402 de banc de lucru. Plasma este depozitată la -80°C până la analiză.

Pentru analiza corticosteronului, sunt preparate standardele de corticosteron (Sigma, 27840) prin diluții seriale în metanol de calitate HPLC, H₂O și adăugarea de 5% ser de șobolan curățat cu cărbune (Bioreclamation, RATSRL-STRPD-HEV). Mostrele de plasmă de șobolan sunt diluate cu PBS, precipitate cu metanol rece, incubate timp de 20 de minute la -20°C, și apoi centrifugate la 14.000 RPM cu o Eppendorf 5417R la 4°C. Sunt extrași supernatanții, evaporați sub un curent de N₂ gazos, și reconstituiți în soluție de MeOH/H₂O (1:1). Mostrele sunt analizate pe LC/MS echipat cu o coloană de HPLC XSelect CSH C18 3,5 μm (2,1 mm x 30 mm) (Waters #186005254).

În experimentele efectuate în mod esențial cum s-a descris pentru acest test, Exemplul 1 nu a demonstrat o creștere a nivelurilor de corticosteron plasmatic la nici una dintre dozele testate în timp ce semaglutida a avut o creștere de aproximativ 4x față de control.

Tabelul 15: Analiza corticosteronului plasmatic la șobolanii Sprague Dawley

	Corticosteron (ng/ml)	
	Medie	SEM
Compus		
Vehicul	60,78	8,41
10 nmoli/kg Semaglutidă	274,57	42,06
3 nmoli/kg Exemplul 1	52,21	19,39
10 nmoli/kg Exemplul 1	32,46	9,78
30 nmoli/kg Exemplul 1	31,35	5,86

Secvențele de aminoacizi

SEQ ID NO: 1 (GIP umană)

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

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

SEQ ID NO: 3 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 4 YX₁EGTFIFSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X₃ este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 5 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X₁ este Aib; X₂ este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 6 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 7 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAFVQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 8 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 9 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₂-CO-(CH₂)₁₆-CO₂H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 10 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)₁-CO-(CH₂)₁₈-CO₂H; X_3 este 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este amidat ca o amidă primară C-terminală.

SEQ ID NO: 11 YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQKAX₃VQWLIAGGPSSGAPPPS

în care X_1 este Aib; X_2 este Aib; K de la poziția 20 este modificat chimic prin conjugare la gruparea epsilon-amino a catenei laterale a K cu ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H în care a este 1 până la 2 și b este 10 până la 20; X_3 este Phe sau 1-Nal; și aminoacidul C-terminal este opțional amidat ca o amidă primară C-terminală.