

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 375**

51 Int. Cl.:
C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08762369 .0**
96 Fecha de presentación: **16.06.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2158214**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2010**

54 Título: **ANÁLOGOS DEL GLUCAGÓN.**

30 Prioridad:
15.06.2007 GB 0711673
15.08.2007 EP 07016032
24.10.2007 US 188 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.12.2011

73 Titular/es:
ZEALAND PHARMA A/S
SMEDELAND 26B
2600 GLOSTRUP, DK

72 Inventor/es:
RIBER, Ditte;
MEIER, Eddi;
NEERUP, Trine Skovlund Ryge y
DAUGAARD, Jens Rosengren

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 371 375 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos del glucagón.

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a análogos del glucagón y a su uso médico, por ejemplo, en el tratamiento de consumo excesivo de alimentos, obesidad y exceso de peso.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Se ha mostrado que el tratamiento de pacientes obesos con el péptido oxintomodulina (Oxm) es eficaz en la obtención de pérdida de peso, y se han hecho varios intentos para obtener un medicamento útil basado en la secuencia de la oxintomodulina humana nativa o modificaciones de la misma [véanse, por ejemplo, los documentos 15 WO03/022304 y WO2004/062685]. La oxintomodulina es conocida por activar tanto el receptor de GLP-1 (péptido 1 similar al glucagón) como el receptor de glucagón, y se ha sugerido que el receptor de GLP-1 es esencial para la función anorexígena de Oxm.

[0003] La oxintomodulina se deriva del proglucagón, que es un péptido de 158 aminoácidos procesado de 20 forma diferente en diferentes órganos. Mientras que el glucagón (29 aminoácidos de longitud; His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr) se produce en el páncreas, el péptido de 37 aminoácidos más largo oxintomodulina (His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala) se produce en el intestino y el cerebro. La oxintomodulina consiste en el glucagón de longitud completa y un 25 octapéptido del extremo C (denominado "péptido interviniente 1" o IP-1, secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala). Tanto el glucagón como el IP-1 fracasan en afectar el consumo de alimentos cuando se administran por separado (Dakin, C.L. y col. (2001), Endocrin. 142, 4244-4250).

[0004] Ambos péptidos son un sustrato para la enzima endógena dipeptidilpeptidasa que se escinde en el 30 lado del extremo C de Ser2 (Zhu, L. y col. (2003), J. Biol. Chem. 278, 22418-22423). Además, se encuentra que un fragmento proteolítico del glucagón es liberado tras la escisión del glucagón en el doblete de aminoácidos Arg17-Arg18 (Blache, P. et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 21748-21753).

RESUMEN DE LA INVENCION

35 [0005] Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que los efectos anorexígenos de Oxm pueden ser imitados por análogos del glucagón que tienen una selectividad aumentada por el receptor de GLP-1. Esto permite que se use un péptido que tiene efectos farmacológicos similares a la oxintomodulina, pero que posiblemente tiene una cadena de péptido primaria más corta que la del glucagón para 40 facilitar la producción mediante síntesis de péptidos en fase sólida.

[0006] También se cree que la actividad agonista del glucagón también puede requerirse para demostrar el efecto anorexígeno.

45 [0007] La invención proporciona un péptido del análogo del glucagón de fórmula:



en la que:

50 R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo), acetilo, formilo, benzoílo o trifluoroacetilo;
 R^2 es NH_2 u OH ;
 Z^1 y Z^2 están independientemente ausentes o son una secuencia de péptidos de 1-20 unidades de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Met, Har, Dbu, Dpr y Om;
 55 o una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo.

[0008] La invención se refiere además a un procedimiento de promoción de la pérdida de peso o prevención del aumento de peso en un sujeto, administrando dicho péptido del análogo del glucagón al sujeto. Por ejemplo, el 60 péptido puede ser útil para el tratamiento de obesidad, trastornos de la alimentación, síndrome metabólico y esteatosis hepática no alcohólica.

[0009] También se proporciona el uso de dicho péptido del análogo del glucagón en la preparación de un medicamento para promover pérdida de peso o prevenir el aumento de peso en un sujeto.

65 [0010] Los procedimientos y usos de la invención también se extienden a ácidos nucleicos que codifican el

péptido del análogo del glucagón, vectores de expresión que comprenden tales ácidos nucleicos y células huésped que contienen tales ácidos nucleicos o vectores de expresión.

5 **[0011]** También se proporciona el péptido del análogo del glucagón, ácido nucleico, vector de expresión o célula huésped como se han descrito para su uso en un procedimiento de promoción de la pérdida de peso o prevención del aumento de peso en un sujeto.

10 **[0012]** También se proporciona el péptido del análogo del glucagón, ácido nucleico, vector de expresión o célula huésped como se han descrito para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.

[0013] El péptido del análogo del glucagón puede tener mayor selectividad por el receptor de GLP-1 que el glucagón humano. Normalmente también tiene actividad antagonista del glucagón, es decir, es un co-agonista de GLP-1/glucagón.

15 **[0014]** La actividad antagonista del GLP-1 o del glucagón de cualquier péptido del análogo del glucagón facilitado puede cuantificarse determinando un valor de CE_{50} para ese péptido en un ensayo seleccionado para actividad del GLP-1 o del glucagón. Como comprenderá el experto, el valor de CE_{50} es una medida de la concentración a la que se logra la mitad de esa actividad máxima del compuesto en el ensayo particular. En esta memoria descriptiva, el valor de CE_{50} en un ensayo para actividad antagonista del GLP-1 o del glucagón se
20 denominará en lo sucesivo $CE_{50}[GLP-1]$ y $CE_{50}[Glu]$, respectivamente. Si se comparan valores de CE_{50} para diferentes compuestos, se entenderá que describen la actividad de los compuestos relevantes en el mismo ensayo bajo condiciones de otro modo idénticas.

25 **[0015]** La relación $CE_{50}[Glu]/CE_{50}[GLP-1]$ para los péptidos del análogo del glucagón puede ser mayor que la relación $CE_{50}[Glu]/CE_{50}[GLP-1]$ para el glucagón. Esto puede interpretarse que significa que el péptido del análogo del glucagón tiene una mayor selectividad por el receptor de GLP-1 que el glucagón.

[0016] El péptido del análogo del glucagón puede tener la fórmula:

30
$$H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKST-NH_2$$

o puede ser una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo.

35 **[0017]** La invención proporciona además un ácido nucleico que codifica el péptido del análogo del glucagón de la invención, un vector de expresión que comprende un ácido nucleico tal y una célula huésped que contiene un ácido nucleico o vector de expresión tal.

40 **[0018]** Además de proporcionar un análogo del glucagón que puede tener estabilidad química y actividad biológica mejorada, la presente invención también se refiere a proporcionar compuestos que tienen actividad antiobesidad y/o reductora de la alimentación en un mamífero o ser humano en necesidad de tratamiento

45 **[0019]** Sin desear ceñirse a ninguna teoría, se cree que la sustitución en la posición 27 puede mejorar la estabilidad oxidativa con respecto al glucagón humano. Similarmente, las sustituciones en las posiciones 20, 24 y 28 pueden aumentar la estabilidad contra la desamidación con respecto al glucagón humano. Por tanto, el análogo del glucagón de la invención puede presentar estabilidad potenciada hacia la desamidación, y/o hacia la degradación oxidativa, con respecto al glucagón natural. Adicionalmente, el péptido de la presente invención puede presentar estabilidad potenciada hacia la degradación *in vivo*, quizás debido a las sustituciones en el sitio de arginina gemelo en la posición 17-18 del glucagón humano.

50 **[0020]** En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido del análogo del glucagón como se define en este documento, o una sal del mismo, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato en mezcla con un vehículo. En realizaciones preferidas, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El péptido del
55 análogo del glucagón puede ser una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del análogo del glucagón.

[0021] Los péptidos del análogo del glucagón descritos se usan en la prevención del aumento de peso o la promoción de la pérdida de peso. Por "prevenir" se indica inhibir o reducir el aumento de peso cuando se compara con la ausencia de tratamiento, y no significa necesariamente que implica el cese completo del aumento de peso.
60 Por tanto, los péptidos pueden usarse para terapia directa o indirecta de cualquier afección producida o caracterizada por exceso de peso corporal, tal como el tratamiento y/o la prevención de obesidad, y/o la prevención de obesidad mórbida y síndrome metabólico, que se caracteriza por hipertrigliceridemia, colesterol de las HDL bajo, elevada apolipoproteína B, partículas de LDL densa pequeña, perfil inflamatorio, resistencia a insulina, hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, fibrinólisis alterada, además de disfunción endotelial y mitocondrial. El
65 síndrome metabólico está altamente asociado a un aumento de la prevalencia de diabetes de tipo 2, hipertensión, arteriosclerosis y enfermedades cardíacas coronarias. Los péptidos pueden producir una disminución en el consumo

de alimentos y/o un aumento del gasto energético, produciendo el efecto observado sobre el peso corporal.

[0022] Como ya se ha descrito, la invención se extiende a vectores de expresión que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos anteriormente descrita, opcionalmente en combinación con secuencias para dirigir su expresión, y células huésped transformadas con los vectores de expresión. Preferentemente, las células huésped pueden expresar y secretar el análogo del glucagón. En todavía un aspecto más, la presente invención proporciona un procedimiento para producir el análogo del glucagón, procedimiento que comprende cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para expresar el análogo del glucagón y purificar el análogo del glucagón así producido.

10 DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0023]

15 La Figura 1 muestra el aumento de peso corporal en ratones con alimentación rica en grasas/dieta rica en grasas (HFD)(DIO) tratados s.c. con vehículo, la amida exendina-4 (1-39) o Compuesto 1 (H-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPPS-NH₂) (SEC ID n° 1), oxintomodulina o Compuesto 2 (H-HSQGTFTSDYSKYLDLDRARADDFVAWLKST-NH₂) (SEC ID n° 2) y el péptido o Compuesto 3 (H-HSQGTFTSDYSKYLDLDRARADDFVAWLKST-NH₂) (SEC ID n° 3) durante 28 días. Los animales que comieron pienso también están incluidos para comparación.

20

La Figura 2 muestra que el efecto reductor de peso del Compuesto 3 es sostenido con el tiempo en comparación con el tratamiento con oxintomodulina y significativamente diferente del tratamiento con exendina-4. Los péptidos de control son los mismos que en la Fig. 1.

25 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0024] En toda la descripción y reivindicaciones se usan los códigos de una letra y de tres letras convencionales para aminoácidos naturales, además de los códigos de tres letras generalmente aceptados para otros α -aminoácidos tales como sarcosina (Sar), norleucina (Nle) y ácido γ -aminoisobutírico (Aib). Todos los residuos de aminoácidos en los péptidos de la invención están preferentemente de la configuración L. Sin embargo, también pueden estar presentes aminoácidos en la configuración D.

[0025] Debe entenderse que los péptidos de la invención también podrían proporcionarse en forma de una sal. Sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición de ácido y sales básicas. Ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Ejemplos de sales básicas incluyen sales en las que el catión se selecciona de metales alcalinos tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos tales como calcio, e iones amonio $R^3(R^4)_3N^+$ en la que R^3 y R^4 designan independientemente alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alqueno C_{2-6} opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17^a edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 y ediciones más recientes, y en Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

[0026] Otros derivados de los análogos del glucagón de la invención son complejos de coordinación con iones metálicos tales como Mn^{2+} y Zn^{2+} , ésteres tales como ésteres hidrolizables *in vivo* e hidratos. Los ésteres pueden formarse entre grupos hidroxilo o ácido carboxílico presentes en el compuesto y un ácido carboxílico o componente de reacción de alcohol apropiado usando técnicas muy conocidas en la técnica.

[0027] El análogo puede comprender una secuencia de péptidos del extremo N o C adicional de 3-20 aminoácidos, por ejemplo, para estabilizar la conformación y/o estructura secundaria del péptido del análogo del glucagón, y/o para hacer que el péptido del análogo del glucagón sea más resistente a la hidrólisis enzimática, por ejemplo, como se describe en el documento WO99/46283. Estas secuencias de péptidos del extremo N y C adicionales se designan Z^1 y Z^2 respectivamente.

55 **[0028]** Si están presentes, Z^1 y Z^2 representan cada uno independientemente una secuencia de péptidos de 3-20 ó 4-20 residuos de aminoácidos, por ejemplo, en el intervalo de 4-15, más preferentemente en el intervalo de 4-10, en particular en el intervalo de 4-7 residuos de aminoácidos, por ejemplo, de 4, 5, 6 ó 7 residuos de aminoácidos tal como 6 residuos de aminoácidos. Cada uno de los residuos de aminoácidos en las secuencias de péptidos Z puede seleccionarse independientemente de Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Met, Orn. Preferentemente, los residuos de aminoácidos se seleccionan de Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Orn y Met, además de aminoácidos que se encuentran dentro de la fórmula I como se define en el documento WO01/04156, por ejemplo, Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico) o Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico), y más preferentemente pueden seleccionarse exclusivamente de Glu, Lys y Met, especialmente Lys. Los aminoácidos anteriormente mencionados pueden tener tanto la configuración D como L, pero preferentemente los aminoácidos 65 anteriormente mencionados tienen una configuración L. Las secuencias Z particularmente preferidas son secuencias de cuatro, cinco, seis o siete residuos de lisina consecutivos (es decir, Lys₃, Lys₄, Lys₅, Lys₆ o Lys₇), y

particularmente cinco o seis residuos de lisina consecutivos. Secuencias Z a modo de ejemplo se muestran en el documento WO 01/04156.

[0029] En ciertas realizaciones preferidas, Z¹ está ausente. En tales casos, Z² puede estar tanto presente como ausente. Si Z¹ está presente, R¹ puede ser H, y si Z² está presente R² puede ser OH.

[0030] Si está presente en el extremo C (Z²), esta secuencia de péptidos adicional no tiene normalmente más del 25% de identidad de secuencias con la secuencia correspondiente de la porción de IP-1 de OXM (que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala).

10

[0031] La "identidad de secuencias de aminoácidos en porcentaje (%)" con respecto a la otra secuencia de polipéptidos (por ejemplo, glucagón, Oxm o IP-1) se calcula como el porcentaje de residuos de aminoácidos en una secuencia de péptidos del análogo del glucagón que son idénticos a los residuos de aminoácidos correspondientes en la secuencia correspondiente de ese otro polipéptido cuando los dos están alineados entre sí, introduciéndose huecos para el alineamiento óptimo, si fuera necesario.

15

Actividad agonista y selectividad por receptor

[0032] Los péptidos del análogo del glucagón descritos en esta memoria descriptiva pueden tener mayor selectividad por el receptor de GLP-1 que el glucagón humano. En algunas realizaciones, también pueden tener mayor actividad antagonista por GLP-1 que el glucagón humano.

20

[0033] La unión de los compuestos relevantes a receptores del GLP-1 o del glucagón puede usarse como indicación de la actividad agonista, pero en general se prefiere usar un ensayo biológico que mide la señalización intracelular producida por la unión del compuesto al receptor relevante. Por ejemplo, la producción de AMP cíclico (cAMP) se usa frecuentemente para monitorizar tanto la actividad del receptor del GLP-1 como del glucagón, y de ahí que pueda usarse para determinar la actividad antagonista de péptidos del análogo del glucagón hacia cada tipo de receptor.

25

[0034] El experto comprenderá formas de ensayo adecuadas, y más adelante se proporcionan ejemplos. El receptor de GLP-1 y/o el receptor del glucagón pueden tener la secuencia de los receptores que se describe en los ejemplos. Por ejemplo, los ensayos pueden hacer uso del receptor del glucagón humano (Glucagón-R) que tiene el número de acceso primario P47871 (GI 1346144) y/o el receptor del péptido 1 similar al glucagón humano (GLP-1-R) que tiene el número de acceso primario P43220 (GI 1169956). (si se citan secuencias de proteínas precursoras debe por supuesto entenderse que los ensayos pueden hacer uso de la proteína madura que carece de la secuencia señal).

30

35

[0035] Los valores de CE₅₀ pueden usarse como medida numérica de la actividad agonista. Un valor de CE₅₀ es una medida de la concentración de un compuesto requerido para lograr la mitad de esa actividad máxima del compuesto en un ensayo particular. Por tanto, un compuesto que tiene CE₅₀[GLP-1] inferior a CE₅₀[GLP-1] del glucagón en un ensayo particular puede considerarse que tiene una mayor actividad antagonista por GLP-1 que el glucagón.

40

[0036] Por "mayor selectividad" por GLP-1 se indica que la relación de la actividad antagonista del compuesto por GLP-1 con respecto a su actividad antagonista del glucagón es superior a la del glucagón. Es decir, para un nivel particular de actividad antagonista del glucagón, el análogo mostrará un mayor nivel de actividad antagonista por GLP-1 que el glucagón. Como los valores de CE₅₀ están inversamente relacionados con la actividad, esto significa que la relación CE₅₀[Glu]/CE₅₀[GLP-1] para el péptido del análogo del glucagón puede ser mayor que la relación CE₅₀[Glu]/CE₅₀[GLP-1] para el glucagón.

45

50

[0037] En algunas realizaciones puede preferirse que el análogo del glucagón tenga una mayor actividad antagonista por GLP-1 que el glucagón humano. (Por consiguiente, puede tener una CE₅₀[GLP-1] menor que la CE₅₀[GLP-1] para el glucagón humano.)

55

[0038] Sin embargo, en otras realizaciones, la actividad antagonista por GLP-1 puede ser sustancialmente similar al, o inferior al, glucagón humano, siempre que la relación de actividad antagonista del GLP-1/glucagón siga siendo mayor para el análogo que para el glucagón humano (es decir, la actividad antagonista del glucagón es correspondiente reducida).

60

[0039] Como se ha mencionado anteriormente, normalmente el péptido del análogo del glucagón también tiene actividad antagonista del glucagón, es decir, es un co-agonista de GLP-1/glucagón.

65

[0040] El péptido del análogo del glucagón puede tener actividad antagonista del glucagón sustancialmente similar a la del glucagón humano (de hecho, puede tener una mayor actividad siempre que la actividad antagonista por GLP-1 sea correspondientemente disminuida). Sin embargo, la actividad antagonista del glucagón también puede ser menor que la del glucagón humano, siempre que sea suficiente para actividad anorexígena.

Estudios de estabilidad

[0041] El experto podrá diseñar procedimientos apropiados (por ejemplo, procedimientos cuantitativos) para la
 5 detección de los productos de degradación de análogos del glucagón, por ejemplo, basándose en aquellos descritos
 más adelante. La degradación puede producirse como oxidación, hidrólisis y desamidación, dependiendo de la
 identidad y posición de los aminoácidos en cualquier análogo del glucagón dado, y condiciones tales como pH,
 disolución y temperatura. Los compuestos pueden clasificarse según estabilidad química cuando los compuestos se
 10 incuban bajo condiciones de estrés (es decir, condiciones que probablemente producen degradación) y
 posteriormente se analizan para el contenido de péptido intacto restante. Además, el conocimiento obtenido sobre
 productos de degradación principales obtenidos bajo condiciones de estrés será importante para cualquier desarrollo
 posterior de procedimientos analíticos.

Ensayos cuantitativos para detectar análogos del glucagón

15 **[0042]** El experto también podrá diseñar procedimientos (por ejemplo, procedimientos cuantitativos) para la
 detección de análogos del glucagón en entornos complejos o disoluciones (por ejemplo, plasma, orina,
 homogeneizados de tejido, homogeneizados de células, saliva o similares) para investigar la absorción, distribución,
 metabolismo y secreción de los análogos del glucagón después de la administración a mamíferos o como parte de
 20 estudios funcionales de sistemas de células *in vitro*.

[0043] En una realización, un ensayo cuantitativo puede basarse en anticuerpos producidos contra los
 análogos del glucagón o fragmentos de los mismos. Los anticuerpos obtenidos a partir de los animales inmunizados
 pueden usarse para ensayos cuantitativos. En un ejemplo, un ELISA de tipo sándwich directo puede prepararse
 25 usando un primer anticuerpo con afinidad de una parte de la molécula inmovilizada en una placa de múltiples
 pocillos. Entonces, la muestra se aplica a los pocillos y el análogo del glucagón es capturado por el primer
 anticuerpo. El análogo del glucagón capturado es luego reconocido por un segundo anticuerpo con afinidad por otra
 parte del análogo del glucagón. El segundo anticuerpo puede marcarse con una enzima (peroxidasa de rábano
 30 picante, fosfatasa alcalina o beta-galactosidasa) o un radioisótopo. La cantidad de análogo del glucagón capturado
 puede detectarse luego mediante la adición de un sustrato colorimétrico o recuento directo de radioemisión o por
 centelleo. Alternativamente, la cantidad de análogo del glucagón capturado puede detectarse indirectamente
 mediante la adición de un anticuerpo marcado con afinidad por el segundo anticuerpo. La concentración en la
 muestra puede estimarse a partir de la respuesta obtenida a partir de una curva patrón externa que contiene
 cantidades conocidas del análogo del glucagón. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para preparar un
 35 inmunoensayo competitivo directo en el que un anticuerpo específico para el análogo del glucagón se inmoviliza
 sobre una placa de múltiples pocillos y la muestra se incuba en los pocillos con una concentración fija predefinida de
 análogo del glucagón marcado. La marca puede ser una enzima, un fluoróforo, un radioisótopo o biotina y detectarse
 usando, por ejemplo, sustratos (por ejemplo, colorimétricos, fluorométricos o quimioluminiscentes) específicos para
 las enzimas, centelleo o avidina ligada a una enzima seguido de detección como se ha descrito anteriormente. La
 40 cantidad de análogo del glucagón marcado unido puede detectarse por un procedimiento apropiado y la
 concentración de análogo del glucagón presente en la muestra derivarse de la respuesta obtenida de una curva
 patrón externa como se ha descrito anteriormente.

[0044] En otra realización, un ensayo cuantitativo puede basarse en la metodología de cromatografía líquida/
 45 espectroscopía de masas en tándem. En un sistema tal, la respuesta de un fragmento específico por el análogo del
 glucagón que va a estudiarse se monitoriza tras la fragmentación del compuesto parental inducido por colisión con
 un gas inerte (He o Ar). Antes de la fragmentación, los componentes de muestra pueden separarse por
 cromatografía de fase inversa o la muestra puede inyectarse directamente en el espectrómetro de masas. Si es
 adecuado, la muestra puede someterse a pretratamiento (es decir, adición de inhibidores de proteasas, precipitación
 50 de proteínas, extracción en fase sólida, extracción por inmunofluorescencia, etc.). La concentración de análogo del
 glucagón presente en la muestra se deriva de la respuesta obtenida de una curva patrón externa como se ha
 descrito anteriormente, posiblemente después de la corrección de la respuesta usando un patrón interno similar al
 análogo del glucagón que va a estudiarse.

55 Generación de anticuerpos específicos

[0045] Los anticuerpos específicos contra los análogos del glucagón o fragmentos del mismo pueden
 inducirse en mamíferos y purificarse a partir del suero. Los análogos del glucagón o fragmentos pueden tanto usarse
 directamente con un adyuvante para inmunizar conejos, ratones u otros mamíferos, como los análogos del glucagón
 60 o fragmentos del mismo pueden ligarse químicamente a una molécula de vehículo (es decir, hemocianina de lapa
 californiana, albúmina de huevo, albúmina, etc.) e inyectarse con un adyuvante. Las inyecciones pueden repetirse
 con intervalos de 2-4 semanas durante periodos prolongados para mejorar la afinidad y selectividad de los
 anticuerpos. Los anticuerpos policlonales pueden recogerse directamente a partir del suero. Para obtener
 anticuerpos monoclonales, los linfocitos B aislados de animales inmunizados, preferentemente ratones, deben
 65 fusionarse con células tumorales para formar hibridomas productores de anticuerpos. El cribado y la selección de los
 clones y anticuerpos apropiados puede realizarse usando tanto análogos del glucagón inmovilizados como péptidos

de los mismos, seguido de detección con anticuerpos marcados. Alternativamente, el cribado y la selección podría basarse en anticuerpos inmovilizados seguido de detección con análogos del glucagón marcados o fragmentos de los mismos. En todos los casos, la marca podría ser un radioisótopo, una enzima, un fluoróforo o biotina y detectarse usando, por ejemplo, sustratos (por ejemplo, colorimétricos, fluorométricos o quimioluminiscentes) específicos para las enzimas, centelleo o avidina ligada a una enzima seguido de detección como se ha descrito.

Síntesis de análogos del glucagón

10 **[0046]** Se prefiere sintetizar los análogos de la invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o fase líquida. En este contexto se hace referencia al documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, a Fields, GB y col., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis" en: Synthetic Peptides (2ª edición) y los ejemplos en este documento.

15 **[0047]** Por tanto, los análogos del glucagón pueden sintetizarse de varias formas que incluyen, por ejemplo, un procedimiento que comprende:

(a) sintetizar el péptido por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o fase líquida y recuperar el péptido sintético así obtenido; o

20

(b) expresar una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido en una célula huésped y recuperar el producto de expresión del cultivo de células huésped; o

25 (c) efectuar la expresión *in vitro* libre de células de una construcción de ácidos nucleicos que codifica el péptido y recuperar el producto de expresión; o

una combinación de los procedimientos de (a), (b) y (c) para obtener fragmentos del péptido, posteriormente ligar los fragmentos para obtener el péptido, y recuperar el péptido.

30 **[0048]** Por tanto, puede ser ventajoso explotar las técnicas de ingeniería genética. Esto puede ser el caso cuando el péptido sea suficientemente grande (o se produzca por una construcción de fusión) y cuando el péptido sólo incluya aminoácidos que se producen naturalmente que pueden traducirse a partir de ARN en organismos vivos.

35 **[0049]** Para el fin de la tecnología de genes recombinantes, los fragmentos de ácido nucleico que codifican los péptidos de la invención son productos químicos importantes. Por tanto, otro aspecto de la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un análogo del glucagón de la invención, en el que el péptido comprende aminoácidos que se producen naturalmente. Los fragmentos de ácido nucleico de la invención son tanto fragmentos de ADN como de ARN.

40

[0050] Los fragmentos de ácido nucleico de la invención se insertarán normalmente en vectores adecuados para formar vectores de clonación o de expresión que llevan los fragmentos de ácido nucleico de la invención; tales vectores novedosos también son parte de la invención. Los detalles de la construcción de estos vectores de la invención serán familiares para el experto y la construcción de tales vectores estará dentro de la capacidad del experto.

45

[0051] Si se produce el péptido de la invención por medio de células transformadas es conveniente, aunque lejos de ser esencial, que el producto de expresión sea tanto exportado (secretado) al medio de cultivo como llevado sobre la superficie de la célula transformada.

50

[0052] Alternativamente, los péptidos pueden prepararse *in vitro* en sistemas libres de células. Esto es especialmente oportuno en casos en los que los péptidos podrían ser tóxicos para células huésped putativas. Por tanto, la presente invención también contempla el uso de traducción/expresión *in vitro* libre de células con el fin de preparar los péptidos de la invención. En este contexto se hace referencia a kits de traducción *in vitro* comercialmente disponibles, materiales y documentación técnica de, por ejemplo, Ambion Inc., 2130 Woodward, Austin, TX 78744-1832, EE.UU.

55

[0053] Finalmente, los procedimientos disponibles pueden combinarse por supuesto de forma que se preparen, por ejemplo, análogos semi-sintéticos. En un sistema tal, los fragmentos de péptidos se preparan usando al menos 2 etapas o procedimientos separados, seguido de ligación de los fragmentos para obtener el producto de péptido final.

60

Composiciones farmacéuticas y administración

65 **[0054]** Los compuestos de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para almacenamiento o administración, y que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un

péptido de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0055] La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero que está tratándose y las características físicas del mamífero específico en consideración. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son muy conocidos para los médicos expertos en las ciencias médicas. Esta cantidad y el procedimiento de administración pueden confeccionarse para lograr la eficacia óptima, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores muy conocidos para aquellos expertos en las ciencias médicas.

[0056] Está dentro de la invención proporcionar una composición farmacéutica en la que el análogo del glucagón, o una sal del mismo, esté presente en una cantidad eficaz en terapia complementaria para mejorar el control glucémico e inducir una pérdida de peso prolongada en personas con obesidad y diabetes de tipo II (por ejemplo, tratadas con antidiabéticos tales como metformina, una sulfonilurea, una glinida, un inhibidor de DPP-IV, una glitazona, insulina o una combinación de antidiabéticos) que no han alcanzado el control glucémico adecuado.

[0057] Además, está dentro de la invención proporcionar una composición farmacéutica en la que el análogo del glucagón, o una sal del mismo, se administra en combinación con uno o varios agentes antiobesidad tales como neuropéptido Y (NPY), proteína relacionada con agouti (AGRP), hormona concentradora de melanina (MCH), hipocretinas/orexinas, grelina, galanina, hormona liberadora de hormona del crecimiento (GHRH), dinorfina, beta-endorfina, Beacon, 26RFa, adiponectina, POMC, CART, neurotensina (NT), colecistocinina (CCK), hormona liberadora de corticotropina (CRH), urocortina, hormona liberadora de tirotropina (TRH), péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), péptido similar a galanina (GALP), PYY(3-36), leptina, neuropéptido K (NPK), péptido relacionado con el gen calcitonina (CGRP), péptido liberador de prolactina (PrRP), neuromedina B, neuromedina U, neuropéptido B (NPB), NPW, somatostatina, oxitocina, bombesina, motilina, enterostatina, amilina, oxintomodulina, bombinacina B o alfa-MSH.

[0058] Las sales farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención que tienen un resto ácido pueden formarse usando bases orgánicas e inorgánicas. Sales adecuadas formadas con bases incluyen sales metálicas tales como sales de metales alcalinos o metales alcalinotérreos, por ejemplo, sales de sodio, potasio o magnesio; sales de amonio y sales de aminos orgánicas tales como aquellas formadas con morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, una mono-, di- o tri-alkil inferior-amina (por ejemplo, etil-terc-butil-, dietil-, diisopropil-, trietil-, tributil- o dimetilpropilamina), o una mono-, di- o trihidroxialquil inferior-amina (por ejemplo, mono-, di- o trietanolamina). También pueden formarse sales internas. Similarmente, si un compuesto de la presente invención contiene un resto básico, las sales pueden formarse usando ácidos orgánicos e inorgánicos. Por ejemplo, pueden formarse sales a partir de los siguientes ácidos: ácido acético, propiónico, láctico, tartárico, succínico, fumárico, maleico, malónico, mandélico, málico, ftálico, clorhídrico, bromhídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanosulfónico, naftalensulfónico, bencenosulfónico, toluenosulfónico y canforsulfónico, además de otros ácidos farmacéuticamente aceptables conocidos. También pueden formarse sales de adición de aminoácido con aminoácidos tales como lisina, glicina o fenilalanina.

[0059] Como es evidente para un experto en la ciencia médica, una "cantidad terapéuticamente eficaz" del péptido o composiciones farmacéuticas de la presente invención variará dependiendo de la edad, peso y de la especie de mamífero tratada, el modo de administración particular y los efectos deseados y la indicación terapéutica. Debido a que estos factores y su relación para determinar esta cantidad son muy conocidos en las ciencias médicas, la determinación de niveles de dosificación terapéuticamente eficaces, la cantidad necesaria para lograr el resultado deseado para prevenir y/o tratar el exceso de peso corporal u obesidad, que incluye obesidad mórbida, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, arteriosclerosis y enfermedades cardíacas coronarias, además de otras indicaciones médicas desveladas en este documento, estará dentro del ámbito del experto.

[0060] Como se usa en este documento, "una cantidad terapéuticamente eficaz" es una que reduce los síntomas de una afección o patología dada, y preferentemente que normaliza las respuestas fisiológicas en un individuo con la afección o patología. La reducción de síntomas o la normalización de respuestas fisiológicas puede determinarse usando procedimientos rutinarios en la materia y puede variar con una afección o patología dada. En un aspecto, una cantidad terapéuticamente eficaz de un análogo del glucagón o composición farmacéutica es una cantidad que restaura un parámetro fisiológico medible a sustancialmente el mismo valor (preferentemente a dentro de + 30%, más preferentemente a dentro de + 20%, y todavía más preferentemente a dentro del 10% del valor) del parámetro en un individuo sin la afección o patología.

[0061] En una realización de la invención, la administración del compuesto o composición farmacéutica de la presente invención comienza a niveles de dosificación más bajos, aumentándose los niveles de dosificación hasta que se logra el efecto deseado para prevenir/tratar la indicación médica relevante tal como el exceso de peso corporal o la obesidad, que incluye obesidad mórbida, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, arteriosclerosis y enfermedades cardíacas coronarias. Esto definiría una cantidad terapéuticamente eficaz. Para el péptido de la presente invención, solo o como parte de una composición farmacéutica, tal dosis puede estar entre aproximadamente 0,01 mg/kg y 100 mg/kg de peso corporal, tal como entre aproximadamente

0,01 mg/kg y 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, entre 10-100 µg/kg de peso corporal.

[0062] Para uso terapéutico, el análogo del glucagón elegido se formula con un vehículo que es farmacéuticamente aceptable y es apropiado para administrar el péptido por la vía de administración elegida. Con el fin de la presente invención, vías parenterales periféricas incluyen vías de administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Ciertos compuestos usados en la presente invención también pueden tratarse por administración por las vías oral, rectal, nasal o respiratorias inferiores. Estas son las llamadas vías no parenterales. La presente composición farmacéutica comprende un análogo del glucagón de la invención, o una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados son aquellos usados convencionalmente con fármacos basados en péptidos tales como diluyentes, excipientes y similares. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son muy conocidos en la ciencia farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, puede usarse solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH ligeramente ácido o fisiológico. Los agentes de tamponamiento del pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), bicarbonato de amonio, dietanolamina, histidina, que es un tampón preferido, arginina, lisina, o acetato o mezclas de los mismos. Los intervalos de tampón preferidos son pH 4-8, pH 6,5-8, más preferentemente pH 7-7,5. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse conservantes tales como para-, meta y orto-cresol, metil- y propilparabeno, fenol, alcohol bencílico, benzoato de sodio, ácido benzoico, benzoato de bencilo, ácido sórbico, ácido propanoico, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse estabilizadores que previenen la oxidación, desamidación, isomerización, racemización, ciclación, hidrólisis de péptidos tales como, por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, triptófano, EDTA, asparagina, lisina, arginina, glutamina y glicina. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse estabilizadores que previenen la agregación, fibrilación y precipitación tales como dodecilsulfato de sodio, polietilenglicol, carboximetilcelulosa, ciclodextrina. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse modificadores orgánicos para la solubilización o la prevención de la agregación tales como etanol, ácido acético o acetato y sales de los mismos. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse agentes de isotonicidad tales como sales, por ejemplo, cloruro sódico o los hidratos de carbono más preferidos, por ejemplo, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa o mezclas de los mismos.

[0063] En la composición farmacéutica pueden proporcionarse detergentes tales como Tween 20, Tween 80, SDS, poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F-68, Pluronic F-127. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse colorantes e incluso aromatizantes. En otra realización se proporciona una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del análogo del péptido de glucagón. Pueden usarse agentes de suspensión.

[0064] En la formulación farmacéutica pueden proporcionarse modificadores orgánicos tales como etanol, terc-butanol, 2-propanol, etanol, glicerol, polietilenglicol para la liofilización de un producto liofilizado. En la composición farmacéutica pueden proporcionarse agentes de carga y agentes de isotonicidad tales como sal, por ejemplo, cloruro sódico, hidratos de carbono, por ejemplo, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa o mezclas de los mismos, aminoácidos, por ejemplo, glicina, glutamato o excipientes tales como cisteína, lecitina o albúmina de suero humano, o mezclas de los mismos para liofilización.

[0065] Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse y usarse como comprimidos, cápsulas o elixires para administración por vía oral; supositorios para administración rectal; preferentemente disoluciones estériles o polvo estéril o suspensiones para administración inyectable; y similares. La dosis y el procedimiento de administración puede confeccionarse para lograr eficacia óptima, pero dependerá de factores tales como peso, dieta, medicación concurrente y otros factores que reconocerán aquellos expertos en las ciencias médicas.

[0066] Si la administración va a ser parenteral, tal como intravenosa y subcutánea, por ejemplo, diariamente, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden prepararse en formas convencionales, tanto como disoluciones como suspensiones acuosas; formas sólidas liofilizadas adecuadas para reconstitución inmediatamente antes de uso o suspensión en líquido antes de inyección, o como emulsiones. Se prevé que la pauta de administración para el péptido de la invención sea subcutánea periférica o nasal. Los diluyentes para la reconstitución del producto liofilizado pueden ser un tampón adecuado de la lista anterior, agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, trehalosa, sacarosa, lecitina, albúmina, glutamato sódico, clorhidrato de cisteína; o agua para inyección con adición de detergentes tales como Tween 20, Tween 80, poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F-68 o Pluronic F-127, polietilenglicol, y o con adición de conservantes tales como para-, meta- y orto-cresol, metil- y propilparabeno, fenol, alcohol bencílico, benzoato de sodio, ácido benzoico, benzoato de bencilo, ácido sórbico, ácido propanoico, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, y o con adición de un modificador orgánico tal como etanol, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico o sales de los mismos.

[0067] Además, si se desea, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas tales como agentes humectantes, o agentes de tamponamiento del pH. Pueden utilizarse preparaciones que potencian la absorción (por ejemplo, liposomas, detergentes y ácidos orgánicos).

[0068] En una realización de la invención, los compuestos se formulan para administración por infusión, por ejemplo, cuando se usan como complementos nutricionales líquidos para pacientes en terapia de nutrición parenteral total, o mediante inyección, por ejemplo, subcutáneamente, intraperitoneal o intravenosamente y se utilizan, por consiguiente, como disoluciones acuosas en forma estéril y libre de pirógenos y opcionalmente tamponadas a pH fisiológicamente tolerable, por ejemplo, un pH ligeramente ácido o fisiológico. La formulación para administración intramuscular puede basarse en disoluciones o suspensiones en aceite vegetal, por ejemplo, aceite de canola, aceite de maíz o aceite de soja. Estas formulaciones basadas en aceite pueden estabilizarse por antioxidantes, por ejemplo, BHA (hidroxianisol butilado) y BHT (hidroxitolueno butilado).

[0069] Por tanto, los presentes compuestos de péptidos pueden administrarse en un vehículo tal como agua destilada o en solución salina, solución salina tamponada con fosfato, disoluciones de dextrosa al 5% o aceites. La solubilidad del análogo del glucagón puede potenciarse, si se desea, incorporando un potenciador de la solubilidad tal como detergentes y emulsionantes.

[0070] El excipiente o vehículo acuoso puede complementarse para su uso como inyectables con una cantidad de gelatina que sirve para la liberación prolongada del análogo del glucagón en o cerca del sitio de inyección, para su lenta liberación al sitio de acción deseado. También pueden ser útiles agentes gelificantes alternativos tales como ácido hialurónico como agentes de liberación prolongada.

[0071] Los análogos del glucagón de la invención también pueden formularse como un dispositivo de implantación de liberación lenta para administración prolongada y sostenida del análogo del péptido de glucagón. Tales formulaciones de liberación sostenida pueden estar en forma de un parche posicionado externamente sobre el cuerpo. Ejemplos de formulaciones de liberación sostenida incluyen materiales compuestos de polímeros biocompatibles tales como poli(ácido láctico), poli(ácido láctico-co-glicólico), metilcelulosa, ácido hialurónico, ácido siálico, silicato, colágeno, liposomas y similares. Las formulaciones de liberación sostenida pueden ser de particular interés cuando se desee proporcionar una alta concentración local de un análogo del glucagón de la invención.

[0072] El análogo del glucagón puede utilizarse en forma de un vial o ampolla cargado estéril que contiene una cantidad farmacéuticamente suficiente del péptido, en tanto cantidades de dosis unitaria como de dosis múltiple. El vial o la ampolla pueden contener el análogo del glucagón y el vehículo deseado como una formulación lista para administración. Alternativamente, el vial o la ampolla pueden contener el péptido de glucagón en una forma tal como una forma liofilizada adecuada para reconstitución en un vehículo adecuado tal como agua estéril o solución salina tamponada con fosfato.

[0073] Como una alternativa a las formulaciones inyectables, el análogo del glucagón puede formularse para administración por otras vías. Las formas farmacéuticas orales tales como comprimidos, cápsulas y similares pueden formularse según la práctica farmacéutica convencional.

[0074] Las formas farmacéuticas nasales pueden formularse con adición de potenciadores tales como quitosano o detergentes tales como Tween 20, Tween 80, poloxámeros, por ejemplo, Pluronic F-68, Pluronic F-127; Brij 35, Brij 72, Cremophor EL.

[0075] La dosificación y la pauta terapéutica más apropiadas para el tratamiento del paciente variará por supuesto con la enfermedad o la afección que va a tratarse, y según el peso del paciente y otros parámetros. Sin desear ceñirse a ninguna teoría particular, se espera que la dosis, en el intervalo de $\mu\text{g}/\text{kg}$, y la duración o la frecuencia más corta o más larga del tratamiento pueda producir resultados terapéuticamente útiles. En algunos casos, la pauta terapéutica puede incluir la administración de dosis de mantenimiento apropiadas para prevenir la regresión de tejido que se produce tras el cese del tratamiento inicial. Los tamaños de dosificación y la pauta de dosificación más apropiados para uso humano pueden guiarse por los resultados obtenidos por la presente invención, y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados por la propiedad.

[0076] Un protocolo de dosificación y tratamiento eficaz puede determinarse mediante medios convencionales empezando con una dosis baja en animales de laboratorio y luego aumentando la dosificación a la vez que se monitorizan los efectos, y también variando sistemáticamente la pauta de dosificación. Un médico puede tener en cuenta numerosos factores cuando determina una dosificación óptima para un sujeto dado. Tales consideraciones son conocidas para el experto.

[0077] Una dosis humana de un péptido de glucagón según la invención puede ser en una realización de aproximadamente $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día a aproximadamente $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{día}$ o $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal/día a aproximadamente $10 \text{ mg}/\text{kg}/\text{día}$.

Afecciones médicas

[0078] Los péptidos de la presente invención son útiles como agente farmacéutico para prevenir el aumento de peso corporal o la promoción de la pérdida de peso corporal. Por tanto, son útiles para tratar un individuo que

padece exceso de peso corporal u obesidad, que incluye obesidad mórbida, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, arteriosclerosis y enfermedades cardíacas coronarias.

Ensayos de unión

5

[0079] Las membranas preparadas a partir de células que expresan tanto hGlucagón-R como hGLP-1-R se incubarán con 30 - 100 pM de [¹²⁵I]GLP-1, [¹²⁵I]glucagón en ausencia o presencia de concentraciones crecientes (10^{-12} - 10^{-6} M) de péptidos de prueba en 100 µl de tampón de unión (HEPES 25 mM, CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM y 0,1% de BSA, pH 7,4). La unión no específica definirá a glucagón o GLP-1 1 µM. Las mezclas de ensayo se incubarán durante 30 min a 37°C, seguido de filtración rápida sobre Unifilters (GF/C) que han sido previamente humedecidos en 0,5% de polietilimina durante al menos 120 min antes de uso. Los filtros se lavarán 3 veces con tampón, se secarán durante 90 min a 60°C y se contarán en un contador de centelleo TopCount en presencia de mezcla de centelleo. Los valores de CI₅₀ se estimarán por ajuste de curvas asistido por ordenador.

15 Generación de líneas celulares que expresan receptores del glucagón humano y de GLP-1

[0080] El ADNc que codifica tanto el receptor del glucagón humano (Glucagón-R) (número de acceso primario P47871) o el receptor del péptido 1 similar a glucagón humano (GLP-1R) (número de acceso primario P43220) se clonó a partir de los clones de ADNc BC104854 (MGC:132514/IMAGE:8143857) o BC112126 (MGC:138331/IMAGE:8327594), respectivamente. El ADN que codifica el Glucagón-R o el GLP-1-R se amplificó por PCR usando cebadores que codifican sitios de restricción terminales para la subclonación. Los cebadores del extremo 5' codificaron adicionalmente una secuencia consenso de Kozak próxima para garantizar la traducción eficiente. Los productos de PCR que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se subclonaron en un vector de expresión de mamífero. La fidelidad del ADN que codifica el Glucagón-R y el GLP-1-R se confirmó por secuenciación de ADN. Como el vector de expresión de mamífero codifica adicionalmente resistencia a G418, las células transfectadas pueden seleccionarse aplicando presión de selección con G418. Las células que presentan resistencia a G418 también expresarán lo más probablemente el Glucagón-R o el GLP-1-R. Los vectores de expresión de mamífero que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se transfectaron en células HEK293 por un procedimiento de transfección de fosfato de calcio convencional. 48 h después de la transfección, las células se sembraron para clonación por dilución limitada y se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 en el medio de cultivo. Tres semanas después se recogieron 12 colonias supervivientes de células que expresan Glucagón-R y GLP-1-R, se propagaron y se probaron en los ensayos de eficacia de Glucagón-R y GLP-1-R como se describe más adelante. Se eligieron un clon que expresa Glucagón-R y un clon que expresa GLP-1-R para el perfilado de compuestos.

35 Receptor del glucagón y ensayos de eficacia del receptor de GLP-1

[0081] Células HEK293 que expresan el hGlucagón-R, o hGLP-1-R, se siembran a 40.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con 0,01% de poli-L-lisina y se cultivan durante 1 día en cultivo en medio de crecimiento 100 µM. En el día del análisis se elimina el medio de crecimiento y las células se lavan una vez con tampón Tyrode 200 µl. Las células se incuban en 100 µl de tampón Tyrode que contiene concentraciones crecientes de péptidos de prueba, IBMX 100 µM y glucosa 6 mM durante hasta 15 min a 37°C. La reacción se detiene mediante la adición de 25 µl de HCl 0,5 M y se incuba sobre hielo durante 60 min. El contenido de cAMP se estima usando el kit de cAMP FlashPlate® de Perkin-Elmer. La CE₅₀ y la eficacia relativa se estiman por ajuste de curvas asistido por ordenador.

45

[0082] Los inventores probaron el péptido:



50 y se obtuvieron valores de CE: GluR: 7,3 pM (SD 1,9) y GLP1R: 9,3 pM (SD 1,5) dando una relación de 1,27.

[0083] Los valores correspondientes obtenidos para el glucagón humano fueron GluR: 0,0905 nM y GLP1R: 2,5 nM dando una relación de CE₅₀[Glu]/CE₅₀[GLP-1] de 0,038.

55 **[0084]** Los valores correspondientes obtenidos para la oxintomodulina humana fueron GluR: 0,7759 nM y GLP1 R: 2,400 nM (SD 1,5) dando una relación CE₅₀[Glu]/CE₅₀[GLP-1] de 0,32

[0085] Al volver a probar el Compuesto 3, los valores de CE₅₀ obtenidos fueron del siguiente modo: GluR: 0,49 nM y GLP-1R: 0,23 dando una relación CE₅₀[Glu]/CE₅₀[GLP-1] de 2,13.

60

Efecto del co-agonista de glucagón/GLP-1 sobre el consumo de alimentos y el peso corporal en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO)

[0086] Se prueban agonistas del receptor de glucagón/GLP-1 eficaces en 40 ratones macho C57Bl/6J de 9 - 15 semanas de edad que habían seguido una dieta rica en grasas (HFD) - 60% de alimento rico en grasas (nº de cat. D12492: 20% de proteína, 20% de hidratos de carbono y 60% de grasa, 5,2 kcal/g; Research Diets, Nueva

Jersey, EE.UU., durante 4 semanas. El alimento rico en grasas contuvo aceite de soja (25/773,85 g) y manteca (245/773,85 g).

[0087] Los ratones DIO se tratan con vehículo o co-agonistas durante 2 - 4 semanas por administración en bolo (s.c.) dos veces al día. El peso corporal se monitoriza diariamente durante todo el experimento. Al final del periodo experimental los animales se sacrifican, la sangre se recoge para el análisis de hemoglobina glicosilada y una variedad de hormonas y péptidos implicados en la regulación del apetito, el consumo de alimentos, el peso corporal y los balances energéticos. Además, se diseccionan y se pesan las almohadillas de grasa epididimal/perigonadal y la grasa retroperitoneal (WAT), además del tejido adiposo pardo intraescapular (BAT).

EJEMPLOS

Efecto del co-agonista de glucagón/GLP-1 H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKST-NH₂ (Compuesto 3) y los péptidos de control exendina-4 (Compuesto 1) y oxintomodulina (Compuesto 2) sobre el peso corporal en ratones obesos inducidos por dieta (DIO)

[0088] El Compuesto 3, exendina-4, y la oxintomodulina se probaron en 10 ratones macho C57BI/6J de 11 - 14 semanas de edad que habían seguido una dieta rica en grasas (HFD) - 60% de alimento rico en grasas (nº de cat. D12492: 20% de proteína, 20% de hidratos de carbono y 60% de grasa, 5,2 kcal/g; Research Diets, Nueva Jersey, EE.UU., durante 4 semanas. El alimento rico en grasas contenía aceite de soja (25 g/773,85 g) y manteca (245 g/773,85 g). Todos los péptidos se prepararon según síntesis de péptidos en fase sólida, por ejemplo, como se ha descrito en los documentos WO 98/11126 y WO 99/46283. Los péptidos usados en el experimento tienen los siguientes datos analíticos:

Nombre del fármaco	MW (g/mol)	Contenido de péptidos	Pureza	Disolvente
Exendina-4 (Compuesto 1)	4187	88	98	PBS
Oxintomodulina (Compuesto 2)	4450	83	91	PBS
Compuesto 3	3365,7	83,1	90	PBS

[0089] Tras un tratamiento de aclimatación con 100 µl de vehículo (PBS) una vez al día durante dos semanas, los ratones DIO se trataron con vehículo, péptidos de control o el Compuesto 3 durante 4 semanas por administración en bolo (s.c.) dos veces al día. El peso corporal se monitorizó diariamente durante todo el experimento. Al final del periodo experimental, los animales se sacrificaron, la sangre se recogió para el análisis de hemoglobina glicosilada y una variedad de hormonas y péptidos implicados en la regulación del apetito, el consumo de alimentos, el peso corporal y los balances energéticos.

[0090] Antes del inicio del tratamiento con el fármaco, los animales se aleatorizaron en grupos de 10 animales cada uno con un peso corporal promedio similar (BW) y de todos los animales (semana 10 de edad) se obtuvo una muestra de sangre del ojo (1 ml (EDTA)). En la semana 7, 8, 9 y 10 (semana 11, 12, 13 y 14 de edad), los ratones se trataron dos veces al día s.c. con exendina-4, oxintomodulina, el Compuesto 3 o vehículo. Un grupo de animales se mantuvo con pienso regular de manera que sirvió de grupo de control no obeso/no diabético. Para hacer el estrés de la manipulación de los animales comparable a los otros grupos, estos animales se trataron con PBS en la misma pauta que los péptidos probados. Durante todo el estudio, los pesos corporales se obtuvieron diariamente, que se usaron para calcular la dosis de los fármacos. Todas las disoluciones que iban a inyectarse se ajustaron al mismo nivel de pH (pH 6,5) en PBS. Las inyecciones diarias tuvieron lugar entre 8:00-8:30 a.m. y entre 16:00-16:30 p.m. con disoluciones frescas preparadas el mismo día. Antes del sacrificio se obtuvo una muestra de sangre del ojo (1 ml (EDTA)). Todos los animales se sacrificaron al final del experimento por dislocación cervical con anestesia (Hypnorm®-Dormicum®).

[0091] La Figura 1 es un diagrama de columnas que muestra el aumento de peso corporal en ratones alimentados con dieta rica en grasas (DIO) tratados s.c. con vehículo, exendina-4 amida (1-39) (Compuesto 1, H-HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNNGPSSGAPPPS-NH₂), oxintomodulina (Compuesto 2, H-HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNNTKRNRRNIA-OH) y el péptido Compuesto 3 durante 28 días (para la comparación están incluidos animales que comen pienso). La figura muestra que la administración en bolo s.c. de 500 nmol/kg dos veces al día del Compuesto 3 puede reducir el aumento de peso corporal en comparación con el tratamiento con oxintomodulina. (* p<0,05 en comparación con HFD vehículo (prueba a posteriori de Tukey)). La Figura 2 es un diagrama que muestra que el efecto reductor de peso del Compuesto 3 (mismos péptidos de control que en la Fig. 1) es sostenido con el tiempo en comparación con el tratamiento con oxintomodulina y significativamente diferente del tratamiento con exendina-4.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de fórmula:



en la que:

R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo), acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;

R^2 es NH_2 u OH;

- 10 Z^1 y Z^2 están independientemente ausentes o son una secuencia de péptidos de 1-20 unidades de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His, Met, Har, Dbu, Dpr y Om;
o una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo.

15 2. Un compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



en la que:

- 20 R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} (por ejemplo, metilo), acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;

R^2 es NH_2 u OH;

o una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo.

3. Un compuesto según la reivindicación 1 de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable, complejo de coordinación de iones metálicos, éster o hidrato del mismo.

30 4. Un ácido nucleico que codifica un compuesto que tiene la secuencia



- en la que Z^1 y Z^2 están independientemente ausentes o son una secuencia de péptidos de 1-20 unidades de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Asn, Gln, Asp, Glu, Lys, Arg, His y Met.

5. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4.

- 40 6. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 4 o un vector de expresión según la reivindicación 5.

7. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 45 8. Uso de un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en la preparación de un medicamento para prevenir el aumento de peso o promover la pérdida de peso.

9. Uso según la reivindicación 8, en el que el medicamento es para administración a un sujeto que padece obesidad, 50 obesidad mórbida, síndrome metabólico, diabetes de tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria o esteatosis hepática no alcohólica.

10. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un procedimiento de tratamiento médico.

- 55 11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en un procedimiento para prevenir el aumento de peso o promover la pérdida de peso en un sujeto.

12. Un compuesto según la reivindicación 11, en el que el sujeto padece obesidad, obesidad mórbida, síndrome 60 metabólico, diabetes de tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria o esteatosis hepática no alcohólica.

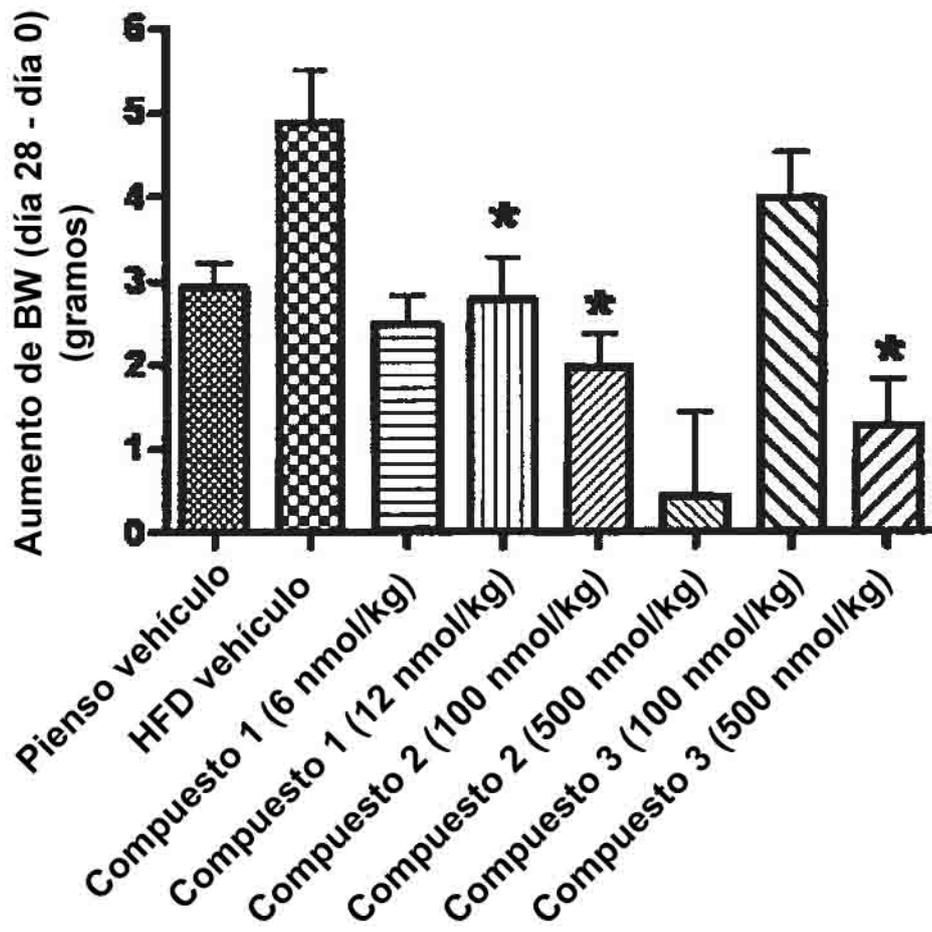


Fig. 1

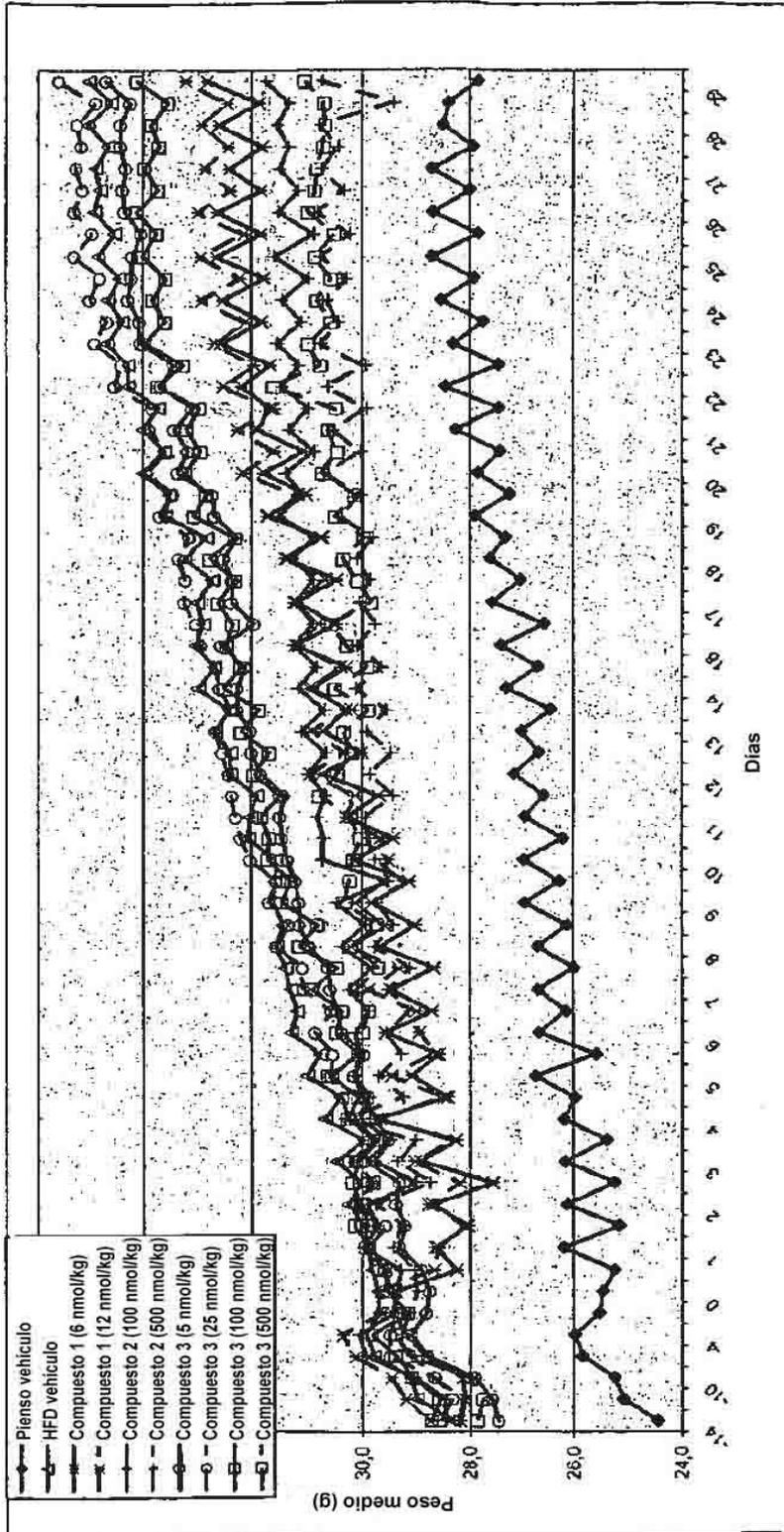


Fig. 2