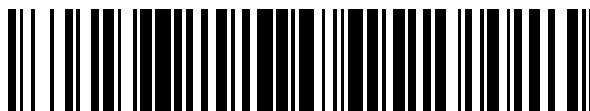


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 880**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2008** **E 08875671 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014** **EP 2370460**

54 Título: **Análogos del glucagón**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2014

73 Titular/es:

ZEALAND PHARMA A/S (100.0%)
Smedeland 36
2600 Glostrup, DK

72 Inventor/es:

MEIER, EDDI;
RIBER, DITTE;
SKOVGAARD, MARIE;
LARSEN, BJARNE DUE y
DAUGAARD, JENS ROSENGREN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 477 880 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 invención**

La presente invención se refiere a análogos del glucagón y a su uso médico, por ejemplo en el tratamiento de una excesiva ingesta de alimentos, obesidad y exceso de peso.

10 **Antecedentes de la invención**

El proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa diferencialmente en los tejidos para formar una serie de péptidos derivados de proglucagón estructuralmente relacionado, incluidos glucagón (Glu), péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), péptido 2 similar al glucagón (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). Estas moléculas están implicadas en una amplia variedad de funciones fisiológicas, incluidas la homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos.

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del proglucagón y que tiene la secuencia 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 (SEC ID N° 1). La oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia completa de 29 aminoácidos del glucagón con una extensión de ocho péptidos en el extremo carboxi (aminoácidos 82 a 89 del proglucagón que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEC ID N° 2) y el denominado "péptido intermedio 1" o IP-1; por tanto, la secuencia completa de la oxintomodulina humana es His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Asn-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEC ID N° 3). El fragmento principal biológicamente activo del GLP-1 se produce como un péptido de 30 aminoácidos amidado en el extremo C que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 de proglucagón.

El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucosa en sangre a través de la unión a los receptores del glucagón sobre los hepatocitos, haciendo que el hígado libere la glucosa almacenada en forma de glucógeno mediante la glucogenólisis. A medida que estas reservas se van vaciando, el glucagón estimula el hígado para sintetizar glucosa adicional mediante la gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en la circulación sanguínea, de modo que se previene el desarrollo de hipoglucemia.

La OXM se libera en la sangre en respuesta a la ingestión de alimentos y, en proporción, al contenido en calorías de la comida. Se ha demostrado que la OXM suprime el apetito e inhibe la ingesta de alimentos en seres humanos (Cohen y col., *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 88, 46964701, 2003; documento WO 2003/022304). Además de dichos efectos anorécticos, que son similares a los del GLP-1, la OXM también debe afectar al peso corporal mediante otro mecanismo, ya que las ratas tratadas con oxintomodulina muestran menos ganancia de peso corporal que las ratas alimentadas del mismo modo. El tratamiento de roedores obesos con OXM también mejora su tolerancia a la glucosa (Parlevliet et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E142-7, 2008) y suprime la ganancia de peso corporal (documento WO 2003/022304).

La OXM activa el receptor del glucagón y el receptor de GLP-1 con una potencia dos veces mayor para el receptor del glucagón sobre el receptor del GLP-1, pero es menos potente que el glucagón nativo y el GLP-1 en sus respectivos receptores. El glucagón también es capaz de activar ambos receptores, aunque con una fuerte preferencia por el receptor del glucagón sobre el receptor del GLP-1. Por otro lado, el GLP-1 no es capaz de activar el receptor del glucagón. El mecanismo de acción de la oxintomodulina no se entiende bien. En concreto, no se sabe si los efectos de la hormona están mediados exclusivamente por el receptor del glucagón y el receptor del GLP-1 o mediante uno o más receptores todavía no identificados.

Se ha demostrado que otros péptidos se unen y activan tanto el glucagón como el receptor del GLP-1 (Hjort et al, *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30121 - 30124) y que suprimen la ganancia del peso corporal y reducen la ingesta de alimentos (documentos WO 2006/134340; WO 2007/100535; WO 2008/101017).

La obesidad se clasifica con un problema de salud globalmente creciente y se asocia con diversas enfermedades, en particular enfermedades cardiovasculares (ECV), diabetes mellitus de tipo 2, apnea del sueño obstructiva, ciertos tipos de cáncer y osteoartritis. Como resultado, se ha encontrado que la obesidad reduce la esperanza de vida. De acuerdo con las proyecciones para 2005 de la Organización Mundial de la Salud, en todo el mundo hay 400 millones de adultos (edad > 15 años) clasificados como obesos. En EE.UU., actualmente se cree que la obesidad es la segunda causa principal de muerte evitable después del tabaquismo.

El aumento de la obesidad conlleva un incremento de la diabetes y aproximadamente el 90 % de las personas con diabetes de tipo 2 se pueden clasificar como obesos. En todo el mundo hay 246 millones de personas con diabetes y para 2025 se ha estimado que 380 millones sufrirán diabetes. Muchos tienen factores de riesgo cardiovascular

adicionales, incluyendo niveles altos/aberrantes de LDL y triglicéridos y niveles bajos de HDL.

Las personas con diabetes tienen una probabilidad de 2 a 4 veces mayor de desarrollar enfermedades cardiovasculares que las personas sin diabetes, convirtiéndolas en la complicación más frecuente de la diabetes. La enfermedad cardiovascular constituye aproximadamente el 50 % de la mortalidad en personas con diabetes. Los adultos jóvenes con diabetes tienen índices de cardiopatía coronaria (CHC) 12-40 veces mayores que los de los adultos jóvenes sin diabetes y, junto con la elevada incidencia y prevalencia de la obesidad y la diabetes de tipo 2, los índices de morbilidad y mortalidad relacionados con estos trastornos metabólicos subrayan la necesidad médica de opciones terapéuticas eficaces.

De acuerdo con lo anterior, existe una fuerte necesidad médica de tratar la obesidad y mejorar la tolerancia a la glucosa.

Sumario de la invención

La invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula R^1 -X-Z- R^2 en la que:

R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} , acetilo, formilo, benzoílo o trifluoroacetilo;

R^2 es OH o NH_2 ;

X es un péptido que tiene la Fórmula I

His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Asp-Phe-Val-Ala-Trp-Leu-Lys-Glu-Ala (SEC ID N° 4)

o difiere de la Fórmula I en hasta 4 de las siguientes posiciones, según lo cual, si es diferente de la Fórmula I:

- el residuo en la posición 2 se selecciona de: Aib, D-Ser;
- el residuo en la posición 16 es: Lys, Asp, Glu;
- el residuo en la posición 18 se selecciona de: Lys, His, Ala, Ser, Tyr;
- el residuo en la posición 20 se selecciona de: Gln, His, Lys, Arg, Glu;
- el residuo en la posición 21 es: Glu;
- el residuo en la posición 24 se selecciona de: Gln, Leu, Glu, Lys, Arg, Asp;
- el residuo en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Arg, Glu, Leu;
- el residuo en la posición 28 se selecciona de: Asn, Ser, Arg, Lys, Ala, Leu, Glu, Asp; y
- el residuo en la posición 29 se selecciona de: Thr, Glu, Lys;

y Z está ausente o una secuencia o 1 - 20 unidades aminoácidas seleccionadas del grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. con la condición de que X no sea His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Arg-Ala-Arg-Ala-Asp-Asp-Phe-Val-Ala-Trp-Leu-Lys-Ser-Thr (SEC ID N° 5).

En algunas realizaciones, X difiere de la Fórmula I en hasta 4 de las siguientes posiciones, según lo cual, si es diferente de la Fórmula I:

- el residuo en la posición 2 se selecciona de: Aib, D-Ser;
- el residuo en la posición 18 se selecciona de: Lys, His, Ala, Ser, Tyr;
- el residuo en la posición 20 se selecciona de: Gln, His, Lys, Arg, Glu;
- el residuo en la posición 24 se selecciona de: Gln, Leu, Glu, Lys, Arg;
- el residuo en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Arg, Glu, Leu;
- el residuo en la posición 28 se selecciona de: Asn, Ser, Arg, Lys, Ala, Leu; y
- el residuo en la posición 29 se selecciona de: Thr, Glu, Lys.

En algunas realizaciones, X comprende los residuos 27-Lys y 28-Ser. En estos casos, X puede diferir adicionalmente de la Fórmula I en una o dos de las siguientes posiciones, según lo cual, si es diferente de la Fórmula I:

- el residuo en la posición 2 se selecciona de: Aib, D-Ser;
- el residuo en la posición 18 se selecciona de: Lys, His, Ala, Ser, Tyr;
- el residuo en la posición 20 se selecciona de: Gln, His, Lys, Arg, Glu;
- el residuo en la posición 24 se selecciona de: Gln, Leu, Glu, Lys, Arg; y
- el residuo en la posición 29 se selecciona de: Thr, Glu, Lys.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, los residuos en las posiciones 16 y 20 pueden ser capaces de formar un puente de sal. Ejemplos de pares adecuados de residuos incluyen:

- 16-Asp, 20-Lys;
- 16-Glu, 20-Lys;
- 16-Asp, 20-Arg;
- 16-Glu, 20-Arg;
- 5 16-Lys, 20-Asp;
- 16-Arg, 20-Asp;
- 16-Lys, 20-Glu; y
- 16-Arg, 20-Glu.

10 Al tiempo que se mantiene la consistencia con las definiciones anteriores, puede ser deseable que X comprenda uno o más de los siguientes conjuntos de residuos:

- 16-Arg;
- 16-Arg, 20-Asp;
- 15 16-Arg, 20-Asp, 24-Ala;
- 16-Arg, 20-Asp, 27-Lys, 28-Ser;
- 16-Arg, 20-Asp, 29-Ala;
- 16-Arg, 27-Lys, 28-Ser;
- 20 16-Arg, 27-Lys, 28-Ser, 29-Ala;
- 24-Ala, 27-Lys, 28-Ser;
- 24-Ala, 27-Lys, 28-Ser, 29-Ala;
- 24-Ala;
- 27-Lys;
- 28-Ser;
- 25 20-Glu, 28-Ser, 29-Thr;
- 24-Glu, 28-Ser, 29-Thr;
- 27-Glu, 28-Arg;
- 2-D-Ser, 28-Ser, 29-Thr; o
- 20-His, 28-Ser, 29-Thr.

30 Por ejemplo, X puede tener la secuencia:

- HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKSA (SEC ID N° 6);
- HSQGTFTSSYKYLDRARADDFVAWLKEA (SEC ID N° 7);
- 35 HSQGTFTSDYSKYLDRARAEDEFVAWLKST (SEC ID N° 8);
- HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVEWLKST (SEC ID N° 9);
- HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLERA (SEC ID N° 10);
- H-D-Ser-QGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKST (SEC ID N° 11); o
- 40 HSQGTFTSDYSKYLDRARAHDFVAWLKST (SEC ID N° 12).

La invención proporciona además un ácido nucleico (que puede ser ADN o ARN) que codifica un compuesto de la invención, un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico y una célula huésped que contiene dicho ácido nucleico o vector de expresión.

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición que comprende un péptido análogo del glucagón como se define en el presente documento, o una sal o derivado del mismo, un ácido nucleico que codifica dicho péptido análogo del glucagón, un vector de expresión que comprende dicho ácido nucleico o una célula huésped que contiene dicho ácido nucleico o vector de expresión, mezclados con un vehículo. En realizaciones preferidas, la composición es una composición farmacéuticamente aceptable y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El análogo peptídico del glucagón puede ser una sal de adición de ácido farmacéuticamente aceptable del análogo del glucagón.

Los compuestos descritos son útiles en la prevención de la ganancia de peso o la estimulación de la pérdida de peso. Por "prevención" se quiere decir inhibir o reducir la ganancia de peso cuando se compara con la ausencia de tratamiento no necesariamente implica el cese completo de la ganancia de peso. Los péptidos pueden producir una disminución de la ingesta de alimentos y/o un incremento del gasto de energía, lo que tiene como resultado el efecto observado sobre el peso corporal. Con independencia de su efecto sobre el peso corporal, los compuestos de la invención pueden tener un efecto beneficioso sobre la tolerancia a la glucosa y los niveles de colesterol circulantes, pudiendo disminuir los niveles de LDL circulantes y de incrementar la proporción HDL/LDL. Por tanto, los compuestos de la invención se pueden usar para terapia directa o indirecta en cualquier afección causada o caracterizada por un exceso de peso corporal, tal como el tratamiento y/o la prevención de la obesidad, la obesidad mórbida, la inflamación relacionada con la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar relacionada con la obesidad, la apnea del sueño inducida por obesidad. También se pueden usar para el tratamiento del síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la dislipidemia aterogénica, la aterosclerosis, la arteriosclerosis, la cardiopatía coronaria o el ictus. Sus efectos en estas afecciones pueden ser un resultado o estar asociado con su efecto sobre el peso corporal, o pueden ser independientes del mismo.

Por tanto, la invención proporciona el uso de un compuesto de la invención en el tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente, en un individuo que lo necesite.

5 La invención también proporciona un compuesto de la invención para uso en un método de tratamiento médico, en particular para el uso en un método de tratamiento de una afección como se ha descrito con anterioridad.

La invención también proporciona el uso de un compuesto de la invención en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

10 Como ya se ha descrito, la invención se extiende a vectores de expresión que comprenden la secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente, opcionalmente en combinación con secuencias para dirigir su expresión, y células huésped que contienen los vectores de expresión. Preferentemente, las células huésped son capaces de expresar y secretar el compuesto de la invención. En un aspecto adicional más, la presente invención proporciona un método de producir el compuesto, comprendiendo el método cultivar las células huésped en condiciones adecuadas para
15 expresar el compuesto y purificar el compuesto producido de este modo.

La invención proporciona además un ácido nucleico de la invención, un vector de expresión de la invención o una célula huésped capaz de expresar y secretar un compuesto de la invención para usar en un método de tratamiento
20 médico. Se entenderá que el ácido nucleico, el vector de expresión y las células huésped se pueden usar para el tratamiento de cualquiera de las afecciones descritas en el presente documento, que se pueden tratar con los propios compuestos. Por tanto, deberá interpretarse que las referencias a una composición terapéutica que comprende un compuesto de la invención, administración de un compuesto de la invención o cualquier uso terapéutico del mismo se deberá interpretar que abarcan el uso equivalente de un ácido nucleico, vector de expresión o célula huésped de la invención, a excepción de cuando el contexto exija lo contrario.

25

Descripción de las figuras

Figure 1. Efecto del tratamiento de 28 días con ZP2495 sobre la ganancia de peso corporal en ratones obesos inducida con la dieta. Ratones C57Bl/6 macho se alimentaron con una dieta rica en grasas (DRG) y se les trató (dos
30 veces al día, s.c.) con ZP2495 (500 nmol/kg) (ZP2495) o vehículo. Un grupo control no obeso mantenido con una alimentación regular se trató con vehículo (CHOW) en el mismo régimen de tratamiento que los grupos DIO. Los pesos corporales se registraron a diario y se usaron para administrar las dosis corregidas según el peso corporal del péptido durante el estudio. ZP2495 disminuyó la ganancia de peso corporal hasta un nivel similar al observado con la alimentación con la dieta.

35

Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta memoria, se usan códigos convencionales de una letra y de tres letras para aminoácidos naturales, así como los códigos de tres letras aceptados de forma general para otros aminoácidos, tales como Aib
40 (ácido α -aminobutírico), Orn (ornitina), Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico) y Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico).

La expresión "glucagón nativo" se refiere a glucagón nativo que tiene la secuencia H-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-OH.

45 Los términos "oxintomodulina" y "OXM" se refieren a oxintomodulina que tiene la secuencia H-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-OH.

La invención proporciona compuestos como se ha definido anteriormente. Para que no haya ninguna duda, en las definiciones anteriores, generalmente se pretende que la secuencia de X solo difiere de la Fórmula en las posiciones que se indican para permitir variaciones. Los aminoácidos dentro de la secuencia X se pueden considerar numeradas consecutivamente de 1 a 29 en la dirección convencional de N-terminal a C-terminal. La referencia a una "posición" en X se deberá interpretar en consecuencia, como deberían también las referencias a las posiciones en el glucagón humano nativo y otras moléculas.

55

Los compuestos de la invención pueden portar uno o más puentes intramoleculares dentro de la secuencia peptídica X. Cada uno de estos puentes se forma adecuadamente entre las cadenas laterales de dos residuos de aminoácidos de X que normalmente están separados por tres aminoácidos en la secuencia lineal de X (es decir, entre el aminoácido A y el aminoácido A+4).

60

Más particularmente, el puente se puede formar entre las cadenas laterales de los pares de residuos 12 y 16, 16 y 20, 17 y 21, 20 y 24 o 24 y 28. Las dos cadenas laterales pueden estar unidas entre sí a través de interacciones iónicas o mediante enlaces covalentes. Por tanto, estos pares de residuos pueden comprender cadenas laterales de cargas opuestas con el fin de formar un puente de sal mediante interacciones iónicas. Por ejemplo, uno de los
65 residuos puede ser Glu o Asp, mientras que el otro puede ser Lys o Arg. Asimismo, una Tyr y un Glu o una Tyr y un Asp son capaces de formar un anillo lactona.

En concreto, los residuos en las posiciones 16 y 20 pueden ser capaces de formar un puente intramolecular. Ejemplos de pares adecuados de residuos en estas posiciones incluyen:

- 5 16-Asp, 20-Lys;
 16-Glu, 20-Lys;
 16-Asp, 20-Arg;
 16-Glu, 20-Arg;
 16-Lys, 20-Asp;
 16-Arg, 20-Asp;
 10 16-Lys, 20-Glu; y
 16-Arg, 20-Glu.

15 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que dichos puentes intramoleculares estabilizan la estructura de alfa hélice de la molécula y, de este modo, aumentan la potencia y/o la selectividad en el receptor del GLP-1 y, posiblemente, en el receptor del glucagón.

20 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que los residuos de arginina en las posiciones 17 y 18 del glucagón nativo proporcionan una selectividad significativa para el receptor de glucagón. Una serie de sustituciones en una o más de estas posiciones puede aumentar la potencia y/o la selectividad para el receptor de GLP-1 y, posiblemente, también el receptor del glucagón. La presencia de Ala en la posición 17 puede también incrementar la estabilidad enzimática del compuesto, especialmente cuando las posiciones 16 y 18 son ambas Arg. Un residuo hidrófobo (p. ej., Ala) en la posición 18 puede también aumentar la potencia en los receptores de GLP-1 y de glucagón.

25 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, parece que los residuos en las posiciones 27, 28 y 29 del glucagón nativo proporcionan una selectividad significativa para el receptor de glucagón. Las sustituciones en uno, dos o las tres posiciones con respecto a la secuencia del glucagón nativo pueden incrementar la potencia y/o la selectividad por el receptor del GLP-1, potencialmente sin producir una reducción significativa de la potencia en el receptor del glucagón. Ejemplos concretos incluyen Lys en la posición 27, Ser en la posición 28 y Ala en la posición 29.

30 La sustitución del residuo Met de origen natural en la posición 27 (p. ej., con Leu, Lys, Arg o Glu) también reduce el potencial de oxidación, de modo que se incrementa la estabilidad química de los compuestos.

35 La sustitución del residuo Asn natural en la posición 28 (p. ej., con Leu, Glu, Ser, Arg, Lys, Ala o Leu) también reduce el potencial de desamidación en solución ácida, de modo que se incrementa la estabilidad química de los compuestos.

40 La potencia y/o la selectividad en el receptor de GLP-1 puede también incrementarse introduciendo residuos que es probable que formen una estructura en hélice antipática, potencialmente sin una pérdida significativa en el receptor del glucagón. Esto se puede conseguir mediante la introducción de residuos cargados en una o más posiciones 16, 20, 24 y 28. Por tanto, los residuos de las posiciones 16 y 20 pueden estar todos cargados o los residuos en las posiciones 16, 20, 24 y 28 pueden estar todos cargados. La presencia de residuos cargados en las posiciones 16 y 20 puede ser particularmente deseable cuando todos son capaces de formar un puente intramolecular, por ejemplo cuando son aminoácidos de cargas opuestas, tales como Arg en la posición 16 y Asp o Glu en la posición 20.

45 La sustitución del residuo Gln natural en la posición 20 (p. ej., con Leu, Glu, Ser, Arg, Lys, Ala o Leu) también reduce el potencial de desamidación en solución ácida, de modo que se incrementa la estabilidad química de los compuestos. Por ejemplo, los compuestos pueden tener Asp o His en la posición 20 y Ala en la posición 24, opcionalmente también con Ser, Glu o Arg en la posición 28.

50 El compuesto puede comprender una secuencia peptídica Z en el extremo C de 1 - 20 aminoácidos, por ejemplo para estabilizar la conformación y/o la estructura del péptido análogo del glucagón y/o para hacer que el péptido análogo del glucagón sea más resistente a la hidrólisis enzimática, por ejemplo como se describe en el documento WO99/46283.

55 Cuando está presente, Z representa una secuencia peptídica de 1 - 20 residuos de aminoácidos, por ejemplo en el intervalo de 1-15, más preferentemente en el intervalo de 1-10, en particular en el intervalo de 1-7 residuos de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 residuos de aminoácidos, tales como 6 residuos de aminoácidos. Cada uno de los residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica de Z pueden seleccionarse, de forma independiente, de Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu (ácido 2,4 diaminobutírico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico) y Orn (ornitina). Preferentemente, los residuos de aminoácidos se seleccionan de Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn, más preferentemente se pueden seleccionar exclusivamente de Glu, Lys y Cys, especialmente de Lys. Los aminoácidos mencionados anteriormente pueden tener una configuración D o L, pero, preferentemente, tienen una configuración L. Secuencias particularmente preferidas para Z 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. Otras secuencias de ejemplo de Z se muestran en el documento WO 01/04156.

Como alternativa, el residuo en el extremo C de la secuencia Z puede ser un residuo de Cys. Esto puede ayudar a la modificación (p. ej., PEGilación) del compuesto. En dichas realizaciones, la secuencia Z puede tener una longitud de, por ejemplo, solo un aminoácido (es decir, Z= Cys) o puede tener una longitud de dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso más aminoácidos. Por tanto, los otros aminoácidos sirven como espaciador entre el péptido X y el residuo de Cys terminal.

La secuencia peptídica Z no tiene una identidad de secuencia superior al 25 % con la correspondiente secuencia de la porción IP-1 de la OXM humana (que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala).

El "porcentaje (%)" de la identidad de secuencia de aminoácidos" de una secuencia peptídica o polipeptídica dada con respecto a otra secuencia polipeptídica (p. ej., IP-1) se calcula como el porcentaje de residuos de aminoácidos en la secuencia peptídica dada que son idénticos a los correspondientes residuos de aminoácidos en la correspondiente secuencia de ese otro polipéptido cuando las dos se alinean una con otra, introduciendo huecos para una alineación óptima en caso necesario. Los valores de % de identidad se pueden determinar mediante WU-BLAST-2 (Altschul y col., Methods in Enzymology 266:460480 (1996)). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen con los valores siguientes: Ciclo de solapamiento = 1, fracción de solapamiento= 0,125, umbral de texto (T)= 11. Un valor de % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina mediante el número de los residuos idénticos equivalentes determinado con WU-BLAST-2, dividido por el número total de residuos de la secuencia de referencia (huecos introducidos por WU-BLAST-2 en la secuencia de referencia para maximizar la puntuación de alineación que se está ignorando) multiplicado por 100.

Por tanto, cuando Z está alineado óptimamente con los 8 aminoácidos de IP-1, no tiene más de dos aminoácidos que son idénticas con los correspondientes aminoácidos de IP-1.

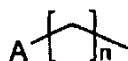
Una o más de las cadenas laterales de aminoácidos en el compuesto de la invención se pueden conjugar a un sustituyente lipófilo. El sustituyente lipófilo puede estar covalentemente unido a un átomo en la cadena lateral de aminoácidos o, como alternativa, puede estar conjugado a la cadena lateral de aminoácidos mediante un espaciador. El aminoácido puede formar parte del péptido X o parte del péptido Z.

Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se piensa que el sustituyente lipófilo se une a la albúmina en la circulación sanguínea, de modo que protege a los compuestos de la invención de la degradación enzimática que puede potenciar la semivida de los compuestos. El espaciador, cuando está presente, se usa para proporcionar un espacio entre el compuesto y el sustituyente lipófilo.

El sustituyente lipófilo puede estar unido a la cadena lateral de aminoácidos o al espaciador a través de un éster, un sulfoniléster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. De acuerdo con esto, se entenderá que, preferentemente, el sustituyente lipófilo incluye un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo N, un átomo O o un átomo S que forma parte del éster, sulfoniléster, tioéster, amida o sulfonamida. Preferentemente, un grupo acilo en el sustituyente lipófilo forma parte de una amida o éster con la cadena lateral de aminoácidos o el espaciador.

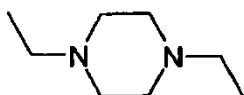
El sustituyente lipófilo puede incluir una cadena de hidratos de carbono que tiene de 4 a 30 átomos de C. Preferentemente tiene al menos 8 o 12 átomos de C y, preferentemente, tiene 24 átomos de C o menos, o 20 átomos de C o menos. La cadena de hidrocarburo puede ser lineal o ramificada y puede ser saturada o insaturada. Se entenderá que la cadena de hidrocarburo está, sustituida, preferentemente, con un resto que forma parte de la unión a la cadena lateral de aminoácidos o al espaciador, por ejemplo un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S. Más preferentemente, la cadena de hidrocarburo está sustituida con acilo y, en consecuencia, la cadena de hidrocarburo puede ser parte de un grupo alcanóilo, por ejemplo palmitoílo, caproílo, lauroílo, miristoílo o estearoílo.

En consecuencia, el sustituyente lipófilo puede tener la fórmula que se muestra a continuación:



A puede ser, por ejemplo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, NH, N-alquilo, un átomo de O o un átomo de S, preferentemente acilo. n es un número entero de 3 a 29, preferentemente al menos 7 o al menos 11 y, preferentemente 23 o menos, más preferentemente 19 o menos.

La cadena de hidrocarburo puede estar sustituida adicionalmente. Por ejemplo, además puede estar sustituido adicionalmente con hasta tres sustituyentes seleccionados de NH₂, OH y COOH. Si la cadena de hidrocarburo está sustituido adicionalmente, preferentemente está sustituido adicionalmente con solo un sustituyente. Como alternativa o adicionalmente, la cadena de hidrocarburo puede incluir un cicloalcanos o heterocicloalcano, por ejemplo como se muestra a continuación:



Preferentemente, el cicloalcanos o heterocicloalcano es un anillo de seis miembros. Más preferentemente, es piperidina.

5 Como alternativa, el sustituyente lipófilo puede estar basado en un esqueleto de ciclopentanofenantreno, que puede estar parcialmente o completamente insaturado, o saturado. Los átomos de carbono en el esqueleto pueden estar cada uno sustituido con Me u OH. Por ejemplo, el sustituyente lipófilo puede ser colilo, desoxicolilo o litocolilo.

10 Como se ha mencionado anteriormente, el sustituyente lipófilo puede estar conjugado con la cadena lateral de aminoácidos a través de un espaciador. Cuando está presente, el espaciador está unido al sustituyente lipófilo y a la cadena lateral de aminoácidos. El espaciador puede estar unido al sustituyente lipófilo y a la cadena lateral de aminoácidos de forma independiente a través de un éster, un sulfoniléster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. De acuerdo con esto, puede incluir dos restos seleccionados de forma independiente de acilo, sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S. El espaciador puede tener la fórmula:



20 En la que B y D se seleccionan cada uno de forma independiente de acilo, sulfonilo, NH, N-alquilo, un átomo de O o un átomo de S, preferentemente de acilo y NH. Preferentemente, n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5. El espaciador puede estar sustituido adicionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₆, aminoalquilo C₀₋₆, hidroxialquilo C₀₋₆ y carboxialquilo C₁₋₆.

25 Como alternativa, el espaciador puede tener dos o más unidades de repetición de la fórmula anterior. B, D y n se seleccionan cada uno de forma independiente para cada unidad de repetición. Las unidades de repetición adyacentes pueden estar unidas covalentemente entre sí a través de sus restos B y D respectivas. Por ejemplo, los restos B y D de las unidades de repetición adyacentes pueden, juntos, formar un éster, un sulfoniléster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. Las unidades B y D libres en cada extremo del espaciador están unidas a la cadena lateral de aminoácidos y el sustituyente lipófilo como se ha descrito anteriormente.

30 Preferentemente, el espaciador tiene cinco o menos, cuatro o menos o tres o menos unidades de repetición. Más preferentemente, el espaciador tiene dos unidades de repetición o es una única unidad.

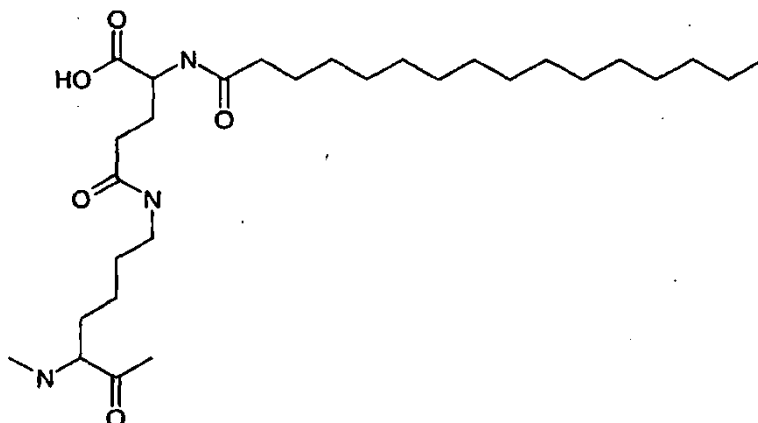
35 El espaciador (o una o más de las unidades de repetición del espaciador, si tiene unidades de repetición) puede ser, por ejemplo, un aminoácido natural o no natural. Se entenderá que para los aminoácidos que tienen cadenas laterales funcionalizadas, B y/o D pueden ser un resto dentro de la cadena lateral del aminoácido. El espaciador puede ser cualquier aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, el espaciador (o una o más unidades de repetición del espaciador, si tiene unidades de repetición) puede ser Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, Trp, His, Lys, Arg, Gln, Asn, α -Glu, γ -Glu, Asp, Ser, Thr, Gaba, Aib, β -Ala, 5-aminopentanoílo, 6-aminohexanoílo, 7-aminohexanoílo, 8-aminooctanoílo, 9-aminononanoílo o 10-aminodecanoílo.

Por ejemplo, el espaciador puede ser un único aminoácido seleccionado de γ -Glu, Gaba, β -Ala y α -Gly.

45 El sustituyente lipófilo puede estar conjugado con cualquier cadena lateral de aminoácidos en los compuestos de la invención. Preferentemente, la cadena lateral de aminoácidos incluye un grupo carboxi, hidroxil, tiol, amida o amina, para formar un éster, un sulfoniléster, un tioéster, una amida o una sulfonamida con el espaciador o el sustituyente lipófilo. Por ejemplo, el sustituyente lipófilo puede estar conjugado con Asn, Asp, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys o Dbu, Dpr u Orn. Preferentemente, el sustituyente lipófilo está conjugado con Lys. No obstante, cualquier aminoácido mostrado como Lys en las fórmulas proporcionadas en el presente documento pueden sustituirse con Dbu, Dpr u Orn cuando se añade un sustituyente lipófilo.

50

Un ejemplo de sustituyente lipófilo y un espaciador se muestra en la fórmula siguiente:



5 Aquí, una Lys del compuesto de la presente invención está unida covalentemente a γ -Glu (el espaciador) a través de un resto amida. Un grupo palmitoílo está unido covalentemente al espaciador γ -Glu a través de un enlace amida.

10 Como alternativa o adicionalmente, una o más cadenas laterales de aminoácidos en el compuesto de la invención se pueden conjugar con un resto polimérico, por ejemplo con el fin de incrementar la solubilidad y/o la semivida un vivo (p. ej., en plasma) y/o la biodisponibilidad. Asimismo, se sabe que dicha modificación reduce el aclaramiento (p. ej., aclaramiento renal) de las proteínas y péptidos terapéuticos.

15 El resto polimérico es, preferentemente, hidrosoluble (anfifílico o hidrofílico), no tóxico y farmacéuticamente inerte. Los restos poliméricos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), homo o copolímeros de PEG, un polímero de PEG sustituido con monometilo (mPEG) o polioxietilenglicerol (POG). Véase el Ejemplo, Int. J. Hematology 68:1 (1998); Bioconjugate Chem. 6:150 (1995); y Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys. 9:249 (1992).

20 Otros restos poliméricos adecuados incluyen poliaminoácidos tales como poli-lisina, poli-ácido aspártico y poli-ácido glutámico (véase, por ejemplo, Gombotz, et al. (1995), Bioconjugate Chem., vol. 6: 332 - 351; Hudecz, et al. (1992), Bioconjugate Chem., vol. 3, 49 - 57; Tsukada, et al. (1984), J. Natl. Cancer Inst. , vol 73,: 721 - 729; y Pratesi, et al. (1985), Br. J. Cancer, vol. 52: 841 - 848).

25 El resto polimérico puede ser lineal o ramificado. Puede tener un peso molecular de 500 - 40.000 Da, por ejemplo 500 - 10.000 Da, 1.000 - 5.000 Da, 10.000 - 20.000, o 20.000 - 40.000 Da.

Un compuesto puede comprender dos o más restos, en cuyo caso el peso molecular total de todos estos restos entrará, en general, dentro de los intervalos proporcionados anteriormente.

30 El resto polimérico puede estar acoplado (mediante enlace covalente) a un grupo amino, carboxilo o tiol de una cadena lateral de aminoácido. Ejemplos preferidos son el grupo tiol de residuos Cys y el grupo Epsilon-amino de residuos Lys y también se pueden usar los grupos carboxilo de los residuos Asp y Glu.

35 El lector experto conocerá técnicas adecuadas que se pueden usar para realizar la reacción de acoplamiento. Por ejemplo, un resto PEG que porta un grupo metoxi se puede acoplar a un grupo tiol de Cys mediante un enlace maleimido usando reactivos disponibles comercialmente en Nektar Therapeutics AL. Véase también el documento WO 2008/101017 y las referencias citadas para detalles de química adecuados.

Síntesis peptídica

40 Los compuestos de la presente invención pueden fabricarse mediante métodos sintéticos estándar, sistemas de expresión recombinantes o mediante cualquier otro método de la técnica. Por tanto, los análogos de glucagón se pueden sintetizar de varias formas incluyendo, por ejemplo, un método que comprende:

45 (a) sintetizar el péptido por medio de una metodología de fase sólida o de fase líquida, bien escalonada o bien mediante ensamblaje de fragmentos, y aislar y purificar el producto peptídico final;

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

50 (c) efectuar expresión *in vitro* sin células de una construcción de ácido nucleico que codifica el péptido y recuperar el producto de expresión;

o mediante cualquier combinación de procedimientos de (a), (b) y (c) para obtener fragmentos del péptido, ligando posteriormente los fragmentos para obtener el péptido y recuperando el péptido.

5 Se prefiere sintetizar los análogos de la invención por medio de síntesis peptídica en fase sólida o fase líquida. A este respecto, se proporcionan referencias en el documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, Fields, GB et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". En: Synthetic Peptides (2ª Edición) y los Ejemplos en el presente documento.

10 Para la expresión recombinante, los fragmentos de ácido nucleico de la invención normalmente se insertarán normalmente en vectores adecuados para formar vectores de clonación o de expresión portadores de los fragmentos de ácido nucleico de la invención; dichos nuevos vectores también son parte de la invención. Los vectores pueden, en función del propósito y el tipo de aplicación, estar en forma de plásmidos, fagos, cósmicos, minicromosomas o virus, pero también el ADN desnudo que sólo se expresa transitoriamente en determinadas células es un vector importante. Los vectores de clonación y expresión (vectores plasmídicos) de la invención
15 preferidos pueden ser capaces de replicarse de forma autónoma, lo que permite un elevado número de copias para los fines de expresión de alto nivel o de replicación de alto nivel para la posterior clonación.

20 En líneas generales, un vector de expresión comprende las siguientes características en la dirección 5'→3' y en una unión operable. Un promotor para dirigir la expresión del fragmento de ácido nucleico de la invención, opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido líder que permite la secreción (a la fase extracelular o, cuando sea aplicable, al periplasma), el fragmento de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención y, opcionalmente, una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador. Pueden comprender características adicionales, tales como marcadores seleccionables y orígenes de replicación. Al operar con vectores de expresión en cepas productoras o líneas celulares, puede preferirse que el vector sea capaz de integrarse en el genoma de la
25 célula huésped. El experto está muy familiarizado con vectores adecuados y es capaz de diseñar uno de acuerdo con sus requisitos específicos.

30 Los vectores de la invención se usan para transformar células huésped para producir el compuesto de la invención. Dichas células transformadas, que también son parte de la invención, pueden ser células o líneas celulares cultivadas usadas para la propagación de los fragmentos de ácido nucleico y vectores de la invención o usarse para la producción recombinante de los péptidos de la invención.

35 Células transformadas preferidas de la invención son microorganismos tales como bacterias (tales como las especies *Escherichia* (p. ej., *E. coli*), *Bacillus* (p. ej., *Bacillus subtilis*), *Salmonella* o *Mycobacterium* (preferentemente no patogénicas, p. ej., *M. bovis* BCG), levaduras (tales como *Saccharomyces cerevisiae*) y protozoos. Como alternativa, las células transformadas pueden proceder de un organismo multilamelar, es decir puede ser una célula fúngica, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula de mamífero. Para los fines de de clonación y/o expresión optimizada se prefiere que la célula transformada sea capaz de replicar el fragmento de ácido nucleico de la invención. Las células que expresan el fragmento de ácido nucleico son realizaciones útiles de la invención, se
40 pueden usar para la preparación a pequeña escala o a gran escala de los péptidos de la invención.

Al producir el péptido de la invención por medio de células transformadas, es conveniente, aunque no esencial, que el producto de expresión se secrete al medio de cultivo.

45 Eficacia

50 La unión de los compuestos relevantes a los receptores de GLP-1 o glucagón (Glu) se puede usar como una indicación de la actividad agonista, pero, en general, se prefiere usar un ensayo biológico que mide la señalización intracelular causada por la unión del compuesto al receptor relevante. Por ejemplo, la activación del receptor del glucagón por un agonista del glucagón estimulará la formación de AMP cíclico (AMPc) celular. De un modo similar, la activación del receptor de GLP-1 por un agonista del GLP-1 estimulará la formación de AMPc celular. Por tanto, la producción de AMPc en células adecuadas que expresan uno de estos dos receptores se puede usar para monitorizar la actividad del receptor relevante. El uso de un par de tipos celulares adecuados, en el que cada uno expresa un receptor pero no el otro, puede, por tanto, usarse para determinar la actividad agonista hacia ambos
55 tipos de receptor.

60 El experto conocerá formatos de ensayo adecuados y más adelante se proporcionan ejemplos. El receptor de GLP-1 y/o el receptor de glucagón pueden tener la secuencia de los receptores como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, los ensayos pueden hacer uso del receptor del glucagón humano (Glucagón-R) que tiene número de acceso primario GI: 4503947 y/o el receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP-1R) humano que tiene número de acceso primario GI:166795283. (Cuando se hace referencia a las secuencias de las proteínas precursoras, por supuesto debe entenderse que los ensayos pueden hacer uso de la proteína madura, que carece de la secuencia señal).

65 Los valores de CE₅₀ se pueden usar como medida numérica de la potencia del agonista en un receptor dado. Un valor de CE₅₀ es una medida de la concentración de un compuesto necesaria para alcanzar la mitad de la actividad

máxima del compuesto en un ensayo concreto. Por tanto, por ejemplo, un compuesto que tiene una CE_{50} [GLP-1] inferior a la CE_{50} [GLP-1R] del glucagón en un ensayo concreto puede considerarse que tiene una potencia mayor en el GLP-1R que el glucagón.

5 Los compuestos descritos en esta memoria son, normalmente, agonistas dobles de Glu-GLP-1, es decir son capaces de estimular la formación de AMPc en el receptor del glucagón y en el receptor de GLP-1. La estimulación de cada receptor se puede medir en ensayos independientes y, después, compararse entre sí.

10 Comparando el valor de la CE_{50} para el receptor del glucagón (CE_{50} [Glucagón-R]) con valor de la CE_{50} para el receptor de GLP-1 (CE_{50} [GLP-1R]) para un compuesto dado se puede encontrar la selectividad relativa por el glucagón (%) de dicho compuesto:

$$\text{Selectividad relativa por el Glucagón-R [Compuesto]} = (1/CE_{50} [\text{Glucagón -R}]) \times 100 / (1/CE_{50} [\text{Glucagón -R}] + 1/CE_{50} [\text{GLP-1R}])$$

15 Asimismo se puede encontrar la selectividad relativa por GLP-1R:

$$\text{Selectividad relativa por GLP-1R [Compuesto]} = (1/CE_{50} [\text{GLP-1R}]) \times 100 / (1/CE_{50} [\text{Glucagón-R}] + 1/CE_{50} [\text{GLP-1R}])$$

20 La selectividad relativa de un compuesto permite comparar su efecto sobre el receptor de GLP-1 o de glucagón directamente con su efecto en el otro receptor. Por ejemplo, cuando mayor es la selectividad relativa por GLP-1 de un compuesto, más eficaz es dicho compuesto sobre el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor del glucagón.

25 Usando los ensayos descritos más adelante, los inventores han encontrado que la selectividad relativa de GLP-1 por el glucagón humano es de aproximadamente 5 %.

30 Los compuestos de la invención tienen una selectividad relativa por el GLP-1R mayor que el glucagón humano. Por tanto, para un nivel concreto de actividad agonista por el glucagón-R, el compuesto mostrará un nivel más alto de actividad agonista del GLP-1R (es decir, mayor potencia en el receptor del GLP-1) que el glucagón. Se entenderá que la potencia absoluta de un compuesto concreto en los receptores de glucagón y GLP-1 puede ser mayor, menor o aproximadamente igual a la del glucagón humano nativo, siempre que se alcance la selectividad relativa adecuada por GLP-1R.

35 No obstante, los compuestos de la presente invención pueden tener una CE_{50} [GLP-1R] menor que el glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE_{50} [GLP-1R] menor que el glucagón, al tiempo que mantienen una CE_{50} [Glucagón-R] que es inferior a 10 veces mayor que la del glucagón humano, inferior a 5 veces la del glucagón humano o inferior a dos veces la del glucagón humano.

40 Los compuestos de la invención pueden tener una CE_{50} [Glucagón-R] que es inferior a dos veces la del glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE_{50} [Glucagón-R] que es inferior a dos veces la del glucagón humano y tienen una CE_{50} [Glucagón-R] que es inferior a la mitad la del glucagón humano, inferior a un quinto de la del glucagón humano o inferior a un décimo de la del glucagón humano.

45 La selectividad relativa por GLP-1 de los compuestos puede ser entre 5 % y 95 %. Por ejemplo, los compuestos pueden tener una selectividad relativa de 5 - 20 %, 10 - 30 %, 20 - 50 %, 30 - 70 %, o 50 - 80 %; o de 30 - 50 %, 40 - 60 %, 50 - 70 % o 75 - 95 %.

Usos terapéuticos

50 Los compuestos de la invención pueden proporcionar una opción terapéutica atractiva para la obesidad y enfermedades metabólicas, incluida la diabetes de tipo 2.

55 La diabetes mellitus, a menudo denominada simplemente diabetes, es un síndrome de metabolismo alterado, normalmente debido a una combinación de causas hereditarias y ambientales, lo que tiene como resultado niveles de azúcar en sangre anormalmente altos (hiperglucemia).

60 Los niveles de azúcar en sangre están controlados por la hormona insulina en las células beta del páncreas. La diabetes se desarrolla debido a la destrucción de las células beta pancreáticas productoras de insulina (en la diabetes de tipo 1) o resistencia a los efectos de la insulina (en la diabetes gestacional), seguido de una pérdida de células beta (en la diabetes de tipo 2). Ambos tipos de diabetes conducen a hiperglucemia que, en gran medida,

produce los signos agudos de diabetes: un exceso de producción de orina, la resultante sed compensatoria y el incremento de la ingesta de fluidos, visión borrosa, inexplicada pérdida de peso, letargo y cambios en el metabolismo de la energía.

- 5 El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólico en una persona. Incluyen obesidad abdominal (exceso de tejido graso alrededor de los órganos internos abdominales), dislipidemia aterogénica (trastornos de grasa en sangre, incluyendo niveles elevados de triglicéridos, niveles bajos de colesterol HDL y/o niveles altos de colesterol LDL, que estimulan la formación de placas en las paredes de las arterias), elevación de la presión arterial (hipertensión), resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (p. ej., niveles elevados del inhibidor 1 del activador de fibrinógeno o plasminógeno en sangre) y un estado proinflamatorio (p. ej., niveles elevados de la proteína C reactiva en sangre).

15 Los individuos con síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de diabetes de tipo 2, así como cardiopatía coronaria y otras enfermedades relacionadas con la acumulación de placas en las paredes de las arterias (p. ej., ictus y enfermedad vascular periférica). Los factores de riesgo subyacentes dominantes para este síndrome parecen ser obesidad abdominal y resistencia a la insulina.

20 Sin desear quedar ligado a teoría alguna, se cree que los compuestos de la invención actúan como agonistas dobles de GluGLP-1. El agonista doble combina el efecto del glucagón sobre el metabolismo de la grasa con los efectos de GLP-1 sobre los niveles de glucosa en sangre y la ingesta de alimentos. Por tanto, podrían actuar de un modo sinérgico para acelerar la eliminación de un excesivo depósito de grasas, inducen una pérdida sostenible de peso y disminuyen directamente los niveles de glucosa mórbidos a niveles normales, sin el riesgo de hipoglucemia, que se asocia con el uso concomitante de agonistas de GLP-1 y sulfonilurea.

25 El efecto sinérgico de los agonistas dobles de GluGLP-1 puede también tener como resultado una reducción de los factores de riesgo cardiovasculares tales como niveles altos de colesterol y LDL, así como una mejora de la tolerancia a la glucosa, que puede ser completamente independiente de su efecto sobre el peso corporal.

30 Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse como agentes farmacéuticos para prevenir la ganancia de peso, estimulación de la pérdida de peso, reducción del exceso de peso corporal y/o tratamiento de la obesidad (p. ej., mediante control del apetito, alimentación, ingesta de alimentos, ingesta de calorías y/o gasto de energía), incluyendo la obesidad mórbida, además de enfermedades, trastornos y estados de la salud asociados, incluyendo, entre otros, inflamación unida a la obesidad, enfermedad de la vesícula biliar ligada a la obesidad y apnea del sueño ligada a la obesidad. Los compuestos de la invención también se pueden usar para el tratamiento del síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la dislipidemia aterogénica, la aterosclerosis, la arteriosclerosis, la cardiopatía coronaria o el ictus. Estas son afecciones que se pueden asociar con obesidad. No obstante, los efectos de los compuestos de la invención sobre estas afecciones pueden estar mediados, totalmente o en parte, por un efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

40

Composiciones farmacéuticas

45 Los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos, se pueden formular como composiciones farmacéuticas preparadas para almacenamiento o administración, que normalmente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, o una sal del mismo, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, el tipo de mamífero que se esté tratando y las características físicas del mamífero en concreto que se está considerando. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos para los expertos que practican las técnicas médicas. Esta cantidad y el procedimiento de administración se pueden adaptar para alcanzar una eficacia óptima y pueden depender de factores tales como el peso, el régimen alimenticio, la medicación concurrente y otros factores bien conocidos para los expertos en las técnicas médicas. Los tamaños de dosificación y el régimen de dosificación más adecuados para uso humano se pueden guiar sobre la base de los resultados obtenidos mediante la presente invención y se pueden confirmar en ensayos clínicos adecuadamente diseñados.

60 Una dosificación eficaz y el protocolo del tratamiento se pueden determinar por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y, después, incrementando la dosis al tiempo que se controlan los efectos, y variando sistemáticamente el régimen de dosificación también. Al determinar una dosificación óptima para un sujeto dado, el clínico puede tener en cuenta numerosos factores. Dichas consideraciones son conocidas por el experto.

65 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit.

1985). Por ejemplo se puede usar solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH ligeramente ácido o fisiológico. Los agentes de tamponamiento de pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris(hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), bicarbonato amónico, dietanolamina, histidina, que es un tampón preferido, arginina, lisina o acetato o mezclas de los mismos. El término abarca además cualquier agente enumerado en la Farmacopea de EE.UU. para usar en animales, incluidos seres humanos.

La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a la sal de los compuestos. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables, tales como sales de adición de ácido y sales básicas. Ejemplos de sales de adición de ácido incluyen las sales clorhidrato, las sales citrato y las sales acetato. Ejemplos de sales básicas incluyen sales en las que el catión se selecciona de metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalino-térreos, tales como calcio, e iones de amonio $^+N(R^3)_3(R^4)$, en los que R^3 y R^4 designan de forma independiente 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", 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA., 1985 y ediciones más recientes, y en la Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

"Tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, entre otros, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de la enfermedad estable (es decir, que no empeora), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, alivio o paliación del estado de la enfermedad y remisión (parcial o total), sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia prevista si no está recibiendo tratamiento. "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo, o alterar la patología, de una enfermedad. De acuerdo con esto, "tratamiento" se refiere a tratamiento profiláctico y/o terapéutico o a medidas preventivas. Aquéllos que necesitan tratamiento aquéllos que ya padecen el trastorno así como aquéllos en los que se va a prevenir el trastorno.

Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades adecuadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación empaquetada, en la que el paquete contiene cantidades pequeñas de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos envasados, cápsulas y polvos en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria puede ser una cápsula, gragea o comprimido, o puede ser el número adecuado de cualquiera de estas formas envasadas. Se puede proporcionar en forma inyectable de una única dosis, por ejemplo en forma de lápiz. Las composiciones pueden estar formuladas para cualquier vía y medio de administración adecuados. Vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los usados en formulaciones adecuadas para administración oral, rectal, nasal, tópica (incluidas bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluidas subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica y transdérmica). Las formulaciones pueden presentarse cómodamente en una forma de monodosis y pueden prepararse mediante cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de farmacia.

Los modos de administración subcutánea o transdérmica pueden ser particularmente adecuados para los compuestos descritos en el presente documento.

Terapia de combinación

El compuesto de la invención se puede administrar como parte de una terapia de combinación con un agente para el tratamiento de la diabetes, obesidad o hipertensión.

En dichos casos, los dos agentes activos se pueden administrar juntos o por separado y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones separadas.

Por tanto, el compuesto de la invención (o la sal del mismo) se puede usar en combinación con un agente antidiabético, incluidos, entre otros, metformina, una sulfonilurea, una glinida, un inhibidor de DPP-IV, una glitazona o insulina. En una realización preferida, el compuesto o sal del mismo se usa en combinación con insulina, un inhibidor de DPP-IV, sulfonilurea o metformina, particularmente sulfonilurea o metformina, para alcanzar un control glucémico adecuado. En una realización incluso más preferida, el compuesto o sal del mismo se usa en combinación con insulina o un análogo de la insulina para alcanzar un control glucémico adecuado. Ejemplos de análogos de insulina incluyen, entre otros, Lantu, Novorapid, Humalog, Novomix y Actraphane HM.

El compuesto o sal del mismo pueden usarse además en combinación con un agente anti-obesidad, incluidos, entre otros, un agonista del receptor del péptido 1 similar al glucagón, el péptido YY o un análogo del mismo, un antagonista del receptor cannabinoide 1, inhibidor de la lipasa, agonista del receptor 4 de la melanocortina o un antagonista del receptor 1 de la hormona de concentración de melanina.

El compuesto análogo o sal del mismo se puede usar en combinación con un agente anti-hipertensor, incluidos, entre otros, un inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina, bloqueante del receptor de la angiotensina II,

diuréticos, beta-bloqueantes o bloqueantes de los canales de calcio.

MÉTODOS

5 Síntesis general de los análogos del glucagón

La síntesis peptídica de fase sólida se realizó en un sintetizador asistido por microondas usando una estrategia Fmoc estándar en NMP sobre una resina de poliestireno (TentaGel S Ram). Se usó HATU como reactivo de acoplamiento junto con DIPEA como base. Para la desprotección se usó piperidina (20 % en NMP). Pseudoprolinas:
10 Fmoc-Phe-Thr(.Psi. Me, Me pro)-OH y Fmoc-Asp-Ser(.Psi., Me, Me pro)-OH (adquirido en NovaBiochem) se usaron cuando era aplicable.

Escisión:

15 El péptido bruto se escindió de la resina mediante tratamiento con 95//2,5/2,5 % (v/v) TFA/TIS/ agua a TA durante 2 horas. Para los péptidos con una metionina en la secuencia se usó una mezcla de 95/5 % (v/v) de TFA/EDT. La mayor parte del TFA se eliminó a presión reducida y el péptido bruto se precipitó y se lavó con éter dietílico y se dejó secar hasta un peso constante a temperatura ambiente.

20 Purificación mediante HPLC del péptido bruto

Los péptidos brutos se purificaron mediante HPLC de fase inversa estándar en una estación de trabajo PerSeptive Biosystems VISION. Se usó el software VISION 3.0 para el control del instrumento y la adquisición de datos. Los péptidos se analizaron usando EM y se purificaron a más del 90 %, determinado mediante HPLC.

25

Síntesis general de los análogos del glucagón acilados

La estructura del péptido se sintetiza como se ha descrito anteriormente para la síntesis general de análogos de glucagón, con la excepción de que está acilado en la cadena lateral de un residuo de lisina con el péptido todavía
30 unido a la resina y protegido completamente sobre los grupos de la cadena lateral, a excepción de la epsilon-amino sobre la lisina que se va a acilar. La lisina que se va a acilar se incorpora con el uso de Fmoc-Lys(ivDde)-OH. El extremo N del péptido está protegido con un grupo Boc usando Boc₂O en NMP. Mientras que el péptido todavía está unido a la resina, el grupo protector de ivDde se escinde de forma selectiva usando 2 % de hidrato de hidrazina en NMP. La cadena lateral de lisina sin proteger se acopla primero con un aminoácido espaciador como Fmoc-Glu-
35 OtBu, que se desprotege con piperidina y se acila con un ácido graso usando metodología de acoplamiento peptídico estándar como se ha descrito anteriormente. Como alternativa, la histidina en el extremo N podría incorporarse desde el principio como Boc-His(Boc)-OH. La escisión de la resina y la purificación se realizan como se ha descrito en lo que antecede.

40 Análisis de la estabilidad del péptido

Los análogos del glucagón se incubaron como compuestos sólidos a 40 °C y se disolvieron como soluciones en HCl 0,1M acuoso (2 mg/ml). Las soluciones se incubaron a 40 °C. Los análogos del glucagón intactos restantes se midieron a RP-HPLC mediante integración de la señal UV a 220 nm. EL porcentaje restante es una medida de la
45 estabilidad relativa.

El sólido y las soluciones de los compuestos de glucagón se diluyeron, antes del análisis, en disolvente para HPLC hasta una concentración de 0,2 mg/ml y se analizaron en los puntos de tiempo adecuados.

50

Tabla 1. Establecimiento de la HPLC analítica

| | |
|-------------------------|---|
| Columna | Gemini C18 150 x 3 mm |
| Gradiente (tiempo; % B) | (0 – 3 min; 18 %B) (3 – 22 min; 45 %B) (22 – 23 min; 95 %B) (23 – 24 min; 18 %B) (24 – 30 min; 18 %B) |
| Disolvente A | 0,1 % de TFA en 1 % de MeCN:MQW |
| Disolvente B | 0,085 % de TFA en MeCN |
| Caudal: | 0,300 ml/min |
| Volumen de inyección | 35 µl |
| Temp. de la columna | 30 °C |
| Detección UV | 220 nm |

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

El ADNc que codifica el receptor del glucagón humano (glucagón-R) (número de acceso primario P47871) o el receptor 1 del péptido similar al glucagón humano (GLP-1R) (número de acceso primario P43220) se clonaron 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 mediante PCR usando cebadores que codifican sitios de restricción terminales para subclonación. Los cebadores en el extremo 5' codificaban adicionalmente una secuencia consenso casi Kozak para garantizar una traducción eficiente. La fidelidad del ADN que codifica el glucagón-R y el GLP-1-R se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los productos de la PCR que codifican el glucagón-R o el GLP-1-R se subclonaron en un vector de expresión de mamífero que contiene un marcador de resistencia a neomicina (G418).

Los vectores de expresión de mamífero que codifican el glucagón-R o el GLP-1-R se transfectaron en células HEK293 mediante un método de transfección en fosfato cálcico estándar. 48 horas después de la transfección, las células se sembraron para una clonación en dilución límite y se seleccionaron con 1 mg/ml en el medio de cultivo. Tres semanas después se escogieron 12 colonias supervivientes de células que expresan glucagón-R y GLP-1R, se propagaron y se analizaron en los ensayos de eficacia de Glucagón-R and GLP-1-R como se describe más adelante. Un clon de expresión de glucagón-R y un clon de expresión de GLP-1-R se escogieron para el perfil de los compuestos.

Ensayos de eficacia del receptor del glucagón y del receptor de GLP-1

Las células HEK293 que expresan el receptor del glucagón humano o GLP-1R humano se sembraron a 40.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos revestidas con poli-L-lisina al 0,01 % y se cultivaron durante 1 día en cultivo en 100 µl de medio de crecimiento. El día del análisis, se retiró el medio de crecimiento y las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón Tyrode. Las células se incubaron en 100 µl de tampón Tyrode que contiene concentraciones crecientes de péptidos de ensayo, IBMX 100 µM y glucosa 6 mM durante 15 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo mediante la adición de 25 µl de HCl 0,5M y se incubó en hielo durante 60 minutos. El contenido de AMPc se estimó usando el kit para AMPc FlashPlate® de Perkin-Elmer. La CE₅₀ y las eficacias relativas se compararon con compuestos de referencia (glucagón y GLP-1) se estimaron mediante ajuste de curvas asistida por ordenador.

Lipólisis en adipocitos de rata primarios

El efecto de los análogos del glucagón sobre la lipólisis se evaluó en cultivos primarios de adipocitos de rata. Los adipocitos se aislaron de grasa del epidídimo diseccionada de ratas jóvenes adultas Sprague-Dawley normales. Los grumos de grasa se trituraron, se incubaron y se agitaron (220 rpm) con colagenasa (1 mg/ml) en tampón de Krebs-Ringer que contienen 4 % de BSA (KRB-BSA) durante 60 minutos a 37 °C. La suspensión se filtró a través de un filtro de nylon (tamaño de poro 160 µm) y el filtrado se centrifugó a 200 x g durante 3 minutos. El medio subyacente debajo de la capa flotante superior de adipocitos se retiró con una pipeta Pasteur. Los adipocitos se lavaron 3 veces en tampón KRB-BSA mediante resuspensión y centrifugación. Los adipocitos se resuspendieron en KRB-BSA, se mezclaron, se incubaron y se agitaron con compuestos de ensayo en placas de 96 pocillos (50.000 células/pocillo) en un volumen total de 1 ml a 37 °C durante 60 minutos. Las placas se introdujeron en hielo durante al menos 10 minutos después de la incubación, seguido de centrifugación a 200 x g durante 3 minutos. Se recogieron 300 µl del tampón debajo de la capa de adipocitos en una placa de 96 pocillos profundos. Este proceso se repitió dos veces más y los 3 extractos recogidos de cada cultivo se combinaron juntos. El glicerol formado mediante la lipólisis en los cultivos de adipocitos se midió añadiendo reactivo de glicerol libre (200 µl) a los alícuotas (25 µl) del extracto de adipocitos, se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 540 nm.

Efectos del tratamiento de 28 días de ratones obesos inducidos por dieta (DIO) con ZP2495 (SEC ID N° 5) sobre la ganancia de peso corporal

Cuatro semanas antes de los tratamientos con fármaco, ratones C57Bl/6 (7 semanas) (N= 10 – 12 animales en cada grupo) se les administró una dieta rica en grasas (DRG) y su ciclo de día-noche invertido con luces Encendido/Apagado a 20:00/08:00 horas. Los animales experimentales se acondicionaron al tratamiento mediante inyecciones diarias (s.c.) de 0,1 ml de vehículo y se aclimataron para manipular pesándolos dos veces a la semana una semana antes de iniciar las administraciones de fármaco. El día antes de iniciar el experimento, se clasificaron los ratones en grupos con un peso corporal (PC) similar y al día siguiente, los grupos de ratones clasificados se trataron (dos veces al día, s.c.) con ZP2495 (SEC ID N° 5) (500 nmol/kg) o vehículo. Un grupo control no obeso mantenido con una alimentación regular se trató con vehículo en el mismo régimen de tratamiento que los grupos DIO. Los pesos corporales se registraron a diario y se usaron para administrar las dosis corregidas según el peso corporal del péptido durante el estudio. Los animales ayunaron durante la noche antes del sacrificio. Se obtuvo una muestra de sangre del ojo (0,6 ml de EDTA) a la mañana siguiente inmediatamente antes de la dislocación cervical. Las ganancias de peso corporal a lo largo del periodo de tratamiento se calcularon para cada animal restando su peso al inicio del tratamiento.

Los efectos del tratamiento sobre la ganancia del peso corporal se evaluaron mediante ANOVA de 2 vías con repetidas medidas y los análisis post-hoc de Bonferroni se usaron con GraphPad Prism versión 4. Las diferencias se consideraron significativas al nivel de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Ejemplo 1: Estabilidad del péptido

Tabla 2. Resultados para la recuperación medida mediante RP-HPLCA después de estrés.

| Compuesto ZP | Recuperación (%) del péptido sólido | Recuperación (%) HCl 0,1M |
|---------------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Glucagón | 91 | 15 |
| 2495 (SEC ID N° 5) | 91 | 52 |
| 2637 (SEC ID N° 8) | 94 | 53 |
| 2648 (SEC ID N° 12) | 100 | 60 |
| 2650 (SEC ID N° 10) | 96 | 69 |
| 2654 (SEC ID N° 11) | 107 | 27 |

Los resultados de incubación en soluciones de estrés de HCl se muestran en la Tabla 2. Todos los compuestos como sólidos eran estables durante 5 semanas a 40n °C con una recuperación de más de un 90 % de pureza. Los resultados muestran además que los análogos de glucagón analizados tienen una mayor estabilidad frente a la degradación ácida en comparación con el glucagón nativo.

15

Ejemplo 2: Eficacia con glucagón y receptores de GLP-1

Tabla 3. Valores de CR50 de análogos del glucagón y receptores de GLP-1

| | | CE ₅₀ de GLP-1R (nM) | CE ₅₀ de GLUR (nM) |
|----------------------|--|---------------------------------|-------------------------------|
| Glucagón | | 2,0 | 0,10 |
| OXM | | 1,0 | 0,50 |
| Exendina-4 | | 0,02 | > 1.000 |
| ZP2495 (SEC ID N° 5) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKST-NH2 | 0,23 | 0,50 |
| ZP2634 (SEC ID N°6) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKSA-NH2 | 0,20 | 0,50 |
| ZP2635 (SEC ID N°7) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKEA-NH2 | 0,20 | 0,20 |
| ZP2637 (SEC ID N°8) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARAEDFVAWLKST-NH2 | 0,10 | 0,20 |
| ZP2649 (SEC ID N°9) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVEWLKST-NH2 | 0,10 | 0,30 |
| ZP2650 (SEC ID N°10) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLERA-NH2 | 0,80 | 0,07 |
| ZP2654 (SEC ID N°11) | H-H-DSer-QGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKST-NH2 | 0,80 | 0,50 |
| ZP2648 (SEC ID N°12) | H-HSQGTFTSDYSKYLDRARAHDFFVAWLKST-NH2 | 0,10 | 0,20 |

20 Ejemplo 3: Ensayo de lipólisis

Tabla 4. Estimulación de la lipólisis en cultivos de adipocitos primarios de rata (para detalles véase Métodos).

| Compuesto | CE50 (nM) |
|-----------------------|-------------|
| Exendina-4 | Sin efectos |
| Glucagón | 6 |
| OXM | 180 |
| ZP2495 (SEC ID N° 5) | 137 |
| ZP2648 (SEC ID N° 12) | 26 |
| ZP2650 (SEC ID N° 10) | 15 |
| ZP2654 (SEC ID N° 11) | 326 |
| ZP2649 (SEC ID N° 9) | 57 |

| | |
|---------------------|-----|
| ZP2634 (SEC ID N°6) | 127 |
| ZP2635 (SEC ID N°7) | 93 |
| ZP2637 (SEC ID N°8) | 42 |

5 El agonista de GLP-1, exendina-4, no tuvo ningún efecto sobre la lipólisis en cultivos de adipocitos primarios en contraste con el glucagón y la OXM (Tabla 4). ZP2495 (SEC ID N° 5) y ZP2634 (SEC ID N° 6) eran equipotenciales con OXM, mientras que ZP2648 (SEC ID N° 12) y ZP2650 (SEC ID N° 10) eran 7 – 12 veces tan potentes como OXM.

Ejemplo 4: Efecto de la administración subcutánea sobre la ganancia de peso corporal en ratones obesos inducidos por la dieta

10 ZP2495 (SEC ID N° 5) disminuyó la ganancia de peso corporal hasta un nivel similar al observado con la alimentación con la dieta (Fig. 1). La ganancia de peso corporal fue estadísticamente significativamente menor que la observada en el grupo vehículo.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula $R^1-X-Z-R^2$
 en la que
 5 R^1 es hidrógeno, alquilo C_{1-4} , acetilo, formilo, benzoílo o trifluoroacetilo;
 R^2 es OH o NH_2 ;
 X es un péptido que tiene la fórmula I, His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Arg-Ala-Arg-
 Ala-Asp-Asp-Phe-Val-Ala-Trp-Leu-Lys-Glu-Ala
 o difiere de la Fórmula I en hasta 4 de las siguientes posiciones, según lo cual, si es diferente de la Fórmula I:
 10 el residuo en la posición 2 se selecciona de: Aib, D-Ser;
 el residuo en la posición 16 es: Lys, Asp, Glu;
 el residuo en la posición 18 se selecciona de: Lys, His, Ala, Ser, Tyr;
 el residuo en la posición 20 se selecciona de: Gln, His, Lys, Arg, Glu;
 15 el residuo en la posición 21 es: Glu;
 el residuo en la posición 24 se selecciona de: Gln, Leu, Glu, Lys, Arg, Asp;
 el residuo en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Arg, Glu, Leu;
 el residuo en la posición 28 se selecciona de: Asn, Ser, Arg, Lys, Ala, Leu, Glu, Asp; y
 el residuo en la posición 29 se selecciona de: Thr, Glu, Lys;
 20 y Z está ausente o es una secuencia de 1 - 20 unidades aminoácidas seleccionadas del grupo que consiste en Ala,
 Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn;
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
 con la condición de que X no sea His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Arg-Ala-Arg-Ala-
 25 Asp-Asp-Phe-Val-Ala-Trp-Leu-Lys-Ser-Thr.
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X difiere de la Fórmula I en hasta 4 de las siguientes
 posiciones, según lo cual, si es diferente de la Fórmula I:
 30 el residuo en la posición 2 se selecciona de: Aib, D-Ser;
 el residuo en la posición 18 se selecciona de: Lys, His, Ala, Ser, Tyr;
 el residuo en la posición 20 se selecciona de: Gln, His, Lys, Arg, Glu;
 el residuo en la posición 24 se selecciona de: Gln, Leu, Glu, Lys, Arg;
 el residuo en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Arg, Glu, Leu;
 35 el residuo en la posición 28 se selecciona de: Asn, Ser, Arg, Lys, Ala, Leu; y
 el residuo en la posición 29 se selecciona de: Thr, Glu, Lys.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende los residuos 27-Lys y 28-Ser.
- 40 4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 3, en el que X adicionalmente difiere de la Fórmula I en hasta 4 de
 las siguientes posiciones, según lo cual, si es diferente de la Fórmula I:
 el residuo en la posición 2 se selecciona de: Aib, D-Ser;
 el residuo en la posición 18 se selecciona de: Lys, His, Ala, Ser, Tyr;
 45 el residuo en la posición 20 se selecciona de: Gln, His, Lys, Arg, Glu;
 el residuo en la posición 24 se selecciona de: Gln, Leu, Glu, Lys, Arg; y
 el residuo en la posición 29 se selecciona de: Thr, Glu, Lys.
5. Un compuesto de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los residuos en las
 50 posiciones 16 y 20 pueden formar un puente de sal.
6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende los residuos 16-Arg, 20-Asp.
7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que X comprende uno o
 55 más de los siguientes grupos de residuos:
 16-Arg;
 16-Arg, 20-Asp;
 16-Arg, 20-Asp, 24-Ala;
 60 16-Arg, 20-Asp, 27-Lys, 28-Ser;
 16-Arg, 20-Asp, 29-Ala;
 16-Arg, 27-Lys, 28-Ser;
 16-Arg, 27-Lys, 28-Ser, 29-Ala;
 24-Ala, 27-Lys, 28-Ser;
 65 24-Ala, 27-Lys, 28-Ser, 29-Ala;
 24-Ala;

- 27-Lys; 28-Ser;
20-Glu, 28-Ser, 29-Thr;
24-Glu, 28-Ser, 29-Thr;
27-Glu, 28-Arg;
5 2-D-Ser, 28-Ser, 29-Thr; o
20-His, 28-Ser, 29-Thr.
8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en el que X tiene la secuencia:
- 10 HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKSA (SEC ID N° 6);
HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKEA (SEC ID N° 7);
HSQGTFTSDYSKYLDRARAEDFVAWLKST (SEC ID N° 8);
HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVEWLKST (SEC ID N° 9);
HSQGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLERA (SEC ID N° 10);
15 H-D-Ser-QGTFTSDYSKYLDRARADDFVAWLKST (SEC ID N° 11); o
HSQGTFTSDYSKYLDRARAHDFVAWLKST (SEC ID N° 12).
9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R¹ es H.
- 20 10. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que R² es NH₂.
11. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z tiene una identidad de secuencia no superior al 25 % con la porción correspondiente de la secuencia de IP-1 de la oxintomodulina humana que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala.
- 25 12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que Z tiene una Cys como el residuo en el extremo C.
- 30 13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que Z está ausente.
14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que una o más cadenas laterales del aminoácido, por ejemplo en el péptido X, está conjugada con un sustituyente lipófilo o un resto polimérico.
- 35 15. Un ácido nucleico que codifica un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
16. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15.
- 40 17. Una célula huésped que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 16.
18. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 19. Uso de un compuesto, de un ácido nucleico, de un vector de expresión o de una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la preparación de un medicamento para prevenir la ganancia de peso, estimular la pérdida de peso o para el tratamiento de una afección causada o asociada con un exceso de peso corporal u obesidad, incluyendo obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula biliar relacionada con obesidad y apnea del sueño relacionada con obesidad, o para el tratamiento de la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la dislipidemia aterogénica, la aterosclerosis, la arteriosclerosis, la cardiopatía coronaria o el ictus.
- 50 20. Un compuesto, un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para uso en un método de tratamiento médico.
- 55 21. Un compuesto, un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula huésped de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, para uso en un método de prevenir la ganancia de peso, estimular la pérdida de peso o para el tratamiento de una afección causada o asociada con un exceso de peso corporal u obesidad, incluyendo obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula biliar relacionada con obesidad y apnea del sueño relacionada con obesidad, o para el tratamiento de la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la dislipidemia aterogénica, la aterosclerosis, la arteriosclerosis, la cardiopatía coronaria o el ictus.
- 60

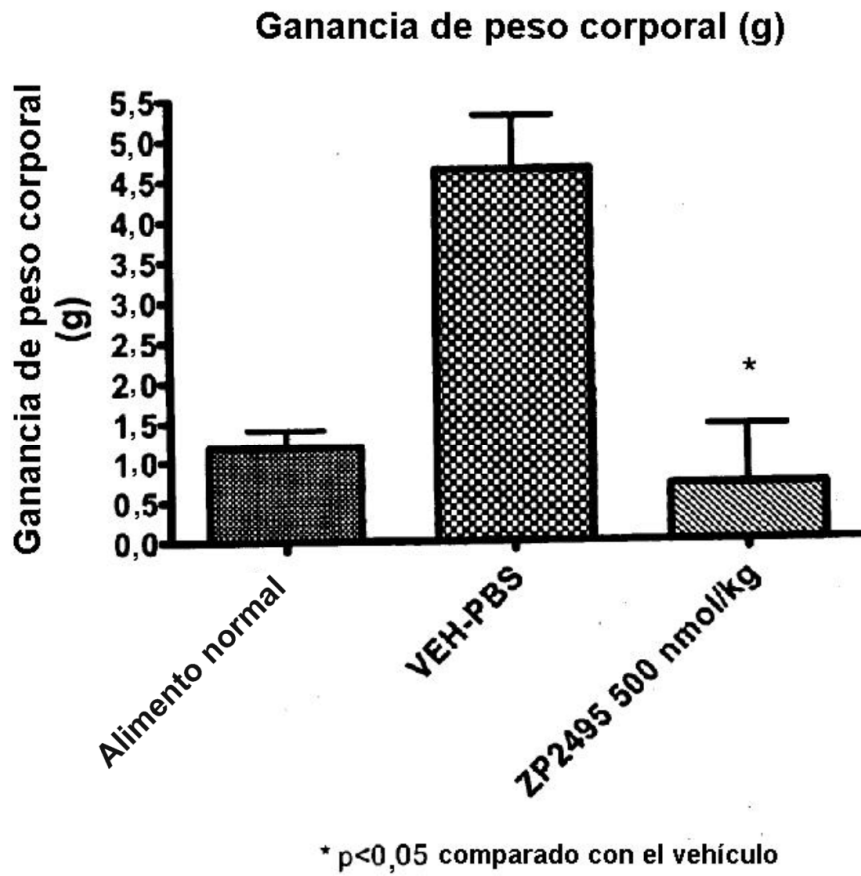


FIG.1