

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 218**

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 08875673 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.07.2014** **EP 2370462**

54 Título: **Análogos de glucagón**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.10.2014

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;
DAUGAARD, JENS ROSENGREN y
NEERUP, TRINE SKOVLUND RYGE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 502 218 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 de glucagón.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a análogos de glucagón y a su uso médico, por ejemplo, en el tratamiento de consumo excesivo de alimentos, obesidad y sobrepeso.

10 **Antecedentes de la invención**

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

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del pre-proglucagón y 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 octapeptídica (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón, que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala (SEC ID N°: 2) en el extremo carboxilo y que se denomina "péptido interviniente 1" o PI-1; la secuencia completa de la oxintomodulina humana es por tanto 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) (SEC ID N°: 3). El fragmento principal biológicamente activo del GLP-1 se produce como un péptido amidado en el extremo C, de 30 aminoácidos, que corresponde los aminoácidos 98 a 127 del preproglucagón.

El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucemia uniéndose a los receptores de glucagón en los hepatocitos, haciendo que el hígado libere glucosa almacenada en forma de glucógeno a través de una glicogenólisis. A medida que estas reservas comienzan a agotarse, el glucagón estimula al hígado para sintetizar glucosa adicional por gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en la corriente sanguínea, impidiendo el desarrollo de hipoglucemia.

La OXM se libera en la sangre en respuesta a la ingesta de alimentos y en proporción al contenido calórico de las comidas. Se ha demostrado que la OXM suprime el apetito e inhibe la ingesta de alimentos en seres humanos (Cohen et al, Journal of Endocrinology and Metabolism, 88, 4696-4701, 2003; WO 2003/022304). Además de estos efectos anorexígenos, que son similares a los del GLP-1, la OXM también debe influir en el peso corporal por otro mecanismo, dado que ratas tratadas con oxintomodulina muestran menos aumento de peso corporal que ratas alimentadas en paralelo (Bloom, Endocrinology 2004, 145, 2687). 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 el aumento de peso corporal (documento WO 2003/022304).

La OXM activa tanto al receptor del glucagón como al del GLP-1 con una fuerza dos veces mayor para el receptor del glucagón sobre el receptor del GLP-1, pero es menos fuerte que el glucagón nativo y que el GLP-1 en sus receptores respectivos. El glucagón humano también puede activar ambos receptores, aunque con una gran preferencia por el receptor del glucagón sobre el receptor del GLP-1. Por otro lado el GLP-1 no puede activar el receptor del glucagón. El mecanismo de acción de la oxintomodulina no se conoce bien. En particular, no se sabe si los efectos de la hormona están mediados a través de los receptores de GLP-1 y los del glucagón, o a través de uno o más receptores no identificados.

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

La obesidad, está clasificada como un problema de salud globalmente en aumento y está asociada con diversas enfermedades, particularmente enfermedad cardiovascular (ECV), diabetes de tipo 2, apnea obstructiva del sueño, determinados tipos de cáncer, y osteoartritis. Como resultado, se ha descubierto que la obesidad reduce la esperanza de vida. De acuerdo con proyecciones del 2005 por la Organización Mundial de la Salud hay 400 millones de personas adultas (edad > 15) clasificadas como obesas en todo el mundo. En los Estados Unidos, actualmente se cree que, después del tabaquismo, la obesidad es la segunda causa principal de muerte prevenible.

El aumento de la obesidad conduce a un aumento de la diabetes, y aproximadamente el 90 % de las personas con diabetes de tipo 2 pueden clasificarse como obesas. Hay 246 millones de personas en todo el mundo con diabetes y se calcula que, en el año 2025, 380 millones de personas tendrán diabetes. Muchas de estas personas tienen factores de riesgo cardiovasculares adicionales, incluyendo niveles altos/aberrantes de LDL y de triglicéridos y niveles bajos de HDL.

Las personas con diabetes tienen de 2 a 4 veces más probabilidades de desarrollar enfermedad cardiovascular que las personas sin diabetes, lo que hace que la complicación de diabetes sea más común. La enfermedad cardiovascular representa aproximadamente el 50 % de la mortalidad en las personas con diabetes. Los adultos jóvenes con diabetes tienen tasas de cardiopatía coronaria (CC) 12-40 veces más altas que las de los adultos jóvenes sin diabetes y junto con la alta incidencia y prevalencia de obesidad y de diabetes de tipo 2, los índices de morbilidad y mortalidad relacionados con estos trastornos metabólicos acentúan la necesidad médica de opciones de tratamiento eficaces

Por consiguiente, existe una gran necesidad médica para el tratamiento de la obesidad y mejora de 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 H, alquilo C_{1-4} , acetilo, formilo, benzoilo 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-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Ile-Glu-Trp-Leu-Leu-Ser-Ala (SEC ID N°: 4)

o difiere de la fórmula I hasta en 4 de las siguientes posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I: el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Alb;

el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys, Glu, Arg;

el resto en la posición 18 es: Ala;

el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu, Asp;

el resto en la posición 21 es: Glu;

el resto en la posición 23 es: Val;

el resto en la posición 24 se selecciona de: Gln, Asp, Lys, Arg, Ala;

el resto en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Lys, Arg, Leu; y

el resto en la posición 28 se selecciona de: Asn, Arg, Lys, Glu, Ala, Glu, Asp;

y Z está ausente o es una secuencia de 1-20 unidades de aminoácidos 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.

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

el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;

el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys;

el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu;

el resto en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Lys; y

el resto en la posición 28 se selecciona de: Asn, Arg, Ala.

En algunas de aquellas realizaciones, X puede diferir de la fórmula I hasta en 3 de las siguientes posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:

el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;

el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys; y

el resto en la posición 20 se selecciona de: Asn, Arg, Ala.

En realizaciones alternativas, X puede diferir de la fórmula I hasta en 4 de las siguientes posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:

el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;

el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys;

el resto en la posición 18 es: Ala; y

el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu.

En realizaciones alternativas adicionales, X puede diferir de la fórmula I hasta en 4 de las siguientes posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:

el resto en la posición 23 es: Val;

el resto en la posición 24 se selecciona de: Gln, Asp, Lys, Arg, Ala;

el resto en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Lys; y
 el resto en la posición 28 se selecciona de: Asn, Arg, Ala.

5 En cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas, los restos en las posiciones 16 y 20 pueden formar un puente salino. Los ejemplos de pares de restos adecuados incluyen:

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

15 Adicionalmente o como alternativa, los restos en las posiciones 20 y 24 pueden ser capaces de formar un puente salino. Los ejemplos de pares de restos adecuados incluyen:

- 20 20-Asp, 24-Lys;
 20 Glu, 24-Lys;
 20-Asp, 24-Arg;
 20-Glu, 24-Arg;
 20-Lys, 24-Asp;
 20-Arg, 24-Asp;
 25 20-Lys, 24-Glu.

Al mismo tiempo que se mantiene la coherencia con las definiciones anteriores, puede ser deseable que X comprenda uno o más de los siguientes grupos de restos:

- 30 20-Lys, 24-Glu;
 20-Lys, 23 Ile, 24-Glu;
 16-Glu, 20-Lys, 24-Glu;
 16-Glu, 20-Lys;
 16-Glu; 20-Lys, 29-Ala;
 35 16-Glu; 20-Lys, 23-Ile; 24-Glu;
 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu;
 27-Leu, 28-Ser, 29-Ala;
 16-Ser;
 20-Gln;
 40 23-Val;
 24-Gln;
 16-Ser, 20-Gln;
 16-Asp, 20-Arg, 24-Asp
 24-Lys; 20-Glu;
 45 24-Arg; o
 28-Arg.

Por ejemplo, X puede tener la secuencia:

- 50 HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA (SEC ID N°: 5);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVEWLLSA (SEC ID N°: 6);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQWLLSA (SEC ID N°: 7);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQLWLLSA (SEC ID N°: 8);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQLWLLSA (SEC ID N°: 9);
 55 HSQGTFTSDYSKYLDKRRRAEDFIKWLLSA (SEC ID N°: 10);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIRWLLSA (SEC ID N°: 11);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLRA (SEC ID N°: 12).
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 13);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 14);
 60 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIDWLLSA (SEC ID N°: 15);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLAA (SEC ID N°: 16); o
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 17).

65 La invención también proporciona un ácido nucleico (que puede ser ADN o ARN) que codifica un compuesto de la invención, un vector de expresión que expresa dicho ácido nucleico y una célula hospedadora que contiene dicho ácido nucleico o vector de expresión.

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 un 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 hospedadora que contiene dicho ácido nucleico o vector de expresión, mezclada 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 ácidos farmacéuticamente aceptable del análogo del glucagón.

Los compuestos descritos encuentran uso previniendo el aumento de peso o estimulando la pérdida de peso. El término "prevención" significa inhibir o reducir el aumento de peso cuando se compara con la ausencia de tratamiento, y no significa necesariamente que implique el cese completo del aumento de peso. Los péptidos pueden producir una disminución en la ingesta de alimento y/o un gasto energético aumentado, dando como resultado el efecto observado sobre el peso corporal. Independientemente de su efecto sobre el peso corporal, los compuestos de la invención pueden tener un efecto beneficioso sobre la tolerancia a la glucosa y sobre los niveles de colesterol en la circulación, pudiendo disminuir los niveles de LDL en circulación y aumentar la proporción HDL/LDL. Por tanto los compuestos de la invención pueden usarse para terapia directa o indirecta de cualquier afección ocasionada o caracterizada por sobrepeso, tal como para el tratamiento y/o la prevención de obesidad, obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedades de la vesícula biliar relacionadas con la obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad. También pueden usarse para el tratamiento del síndrome metabólico, resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arteriosclerosis, cardiopatía coronaria, o ictus. Sus efectos en estas afecciones pueden ser como un resultado de, o estar asociado con, sus efectos sobre el peso corporal, o pueden ser independientes de los mismos.

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.

La invención también proporciona un compuesto de la invención para su uso en un método de tratamiento médico, particularmente para su uso en un método de tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

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.

Como ya se ha descrito, la invención se amplía a vectores de expresión que comprenden la secuencia de ácido nucleico descrita anteriormente, opcionalmente en combinación con secuencias para dirigir su expresión, y células hospedadoras que contienen los vectores de expresión. Preferentemente las células hospedadoras pueden expresar y segregar el compuesto de la invención. En otro aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de producción del compuesto, comprendiendo el método cultivar las células hospedadoras en condiciones adecuadas para expresar el compuesto y purificar el compuesto así producido.

La invención también proporciona un ácido nucleico de la invención, un vector de expresión de la invención, o una célula hospedadora que puede expresar y segregar un compuesto de la invención, para su uso en un método de tratamiento médico. Se entenderá que el ácido nucleico, el vector de expresión y las células hospedadoras pueden usarse para el tratamiento de cualquiera de los trastornos descritos en el presente documento que pueden tratarse con los propios compuestos. Por lo tanto, debe entenderse que, las referencias a una composición terapéutica que comprende un compuesto de la invención, a la administración de un compuesto de la invención o a cualquier uso terapéutico del mismo, incluyen el uso equivalente de un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula hospedadora de la invención salvo que el contexto indique otra cosa.

Descripción de las figuras

Figura 1. Efecto de ZP2663 sobre la tolerancia a glucosa oral en ratones db/db.

Ratones db/db se dejaron en ayunas durante una noche y se tomó una muestra de sangre inicial (nivel de glucemia en ayunas) justo antes de la administración (i.p.) de vehículo o ZP2653 (SEC ID N°: 4) (45 nmol/kg). Quince minutos después se proporcionó una dosis oral de glucosa (1 g/kg en 5 ml/kg) y los niveles de G se midieron a t=30 min, t=60 min, t=120 min y t=240 min. La diferencia desde la línea basal (t=0) se calculó para cada momento y se determinaron los valores del $ABC_{0-240 \text{ min}}$. ZP2663 mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa en ratones db/db diabéticos.

Figura 2. Efecto de ZP2663 en la ingesta de alimento en ratones.

Los grupos de ratones estratificados (estratificados después del peso corporal) ayunaron durante toda la noche y se trataron con PYY₃₋₃₆ (30 nmol/kg) (control positivo interno), glucagón (500 nmol/kg), ZP2663 (500nmol/kg) o vehículo. Después de una hora se introdujo alimento previamente pesado a los ratones y se midió la ingesta de alimento mediante la medida del alimento restante después de una hora y se expresó en relación al peso corporal (mg de alimento/g de PC). PYY(3-36) mostró un efecto anoréxico tal como se esperaba a partir de hallazgos anteriores. ZP2663 (500 nmol/kg) disminuyó significativamente la ingesta de alimento durante la

primera hora siguiente a la inyección del péptido. El glucagón no tuvo ningún efecto en la ingesta de alimento.

Figura 3. Efecto del tratamiento durante 28 días con ZP2663 sobre el aumento del peso corporal en ratones con obesidad inducida por dieta (DIO, por sus siglas en inglés *Diet Induced Obese*).

Ratones macho C57Bl/6 se alimentaron con una dieta rica en grasas (HFD, *High Fat Diet*) y se trataron (d.v.d.; s.c.) con ZP2663 (500 nmol/kg) ZP2663 o con vehículo. Un grupo control no obeso mantenido con pienso regular se trató con vehículo (PIENSO) en el mismo régimen de tratamiento que el de los grupos DIO. Los pesos corporales se registraron diariamente y se usaron para administrar las dosis corregidas en función del peso corporal del péptido a lo largo del estudio. ZP2663 disminuyó el aumento de peso corporal significativamente en comparación con VEH-PBS alcanzando un nivel similar al observado con la alimentación de pienso.

Figura 4. Efecto del tratamiento con el agonista dual Glu-GLP-1 de ratones DIO durante 4 semanas (d.v.d.) sobre concentraciones de colesterol LDL. Los efectos de la OXM (P = 0,002) y de ZP2663 (P = 0,019) fueron significativos en comparación con el vehículo.

Figura 5. Efecto del tratamiento con el agonista dual GluGLP-1 de ratones DIO durante 4 semanas (d.v.d.) sobre las proporciones HDL/LDL. El PBS (pH 7,4) fue el vehículo usado para la OXM, la exendina-4 y ZP2653 (SEC ID N°: 4). Los efectos de la OXM (P = 0,004) y de ZP2653 (SEC ID N°: 4) (P = 0,026) fueron diferentes de un modo estadísticamente significativo del grupo vehículo.

Descripción detallada de la invención

A lo largo de esta memoria descriptiva, se usan los códigos convencionales de una y tres letras de los aminoácidos de origen natural, así como los códigos de tres letras generalmente aceptados de otros aminoácidos, tales como Aib (ácido α -aminoisobutírico), Orn (ornitina), Dbu (ácido 2,4 diaminobutírico) y Dpr (ácido 2,3- diaminopropanoico).

La expresión "glucagón nativo" se refiere al glucagón humano 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 (SEC ID N°: 1) .

Los términos "oxintomodulina" y "OXM" se refieren a la oxintomodulina humana nativa 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 (SEC ID N°: 3) .

La invención proporciona compuestos como se ha definido anteriormente. Para evitar dudas, en las definiciones proporcionadas en el presente documento, se pretende generalmente que la secuencia de X solo difiera de la Fórmula I en aquellas posiciones en las que se indica que se permite la variación. Puede considerarse que los aminoácidos dentro de la secuencia X se numeran consecutivamente de 1 a 29 en la dirección convencional N terminal a C terminal. Por consiguiente, debe entenderse que una referencia a una "posición" dentro de X debe hacer referencia a las posiciones dentro del glucagón humano nativo y otras moléculas.

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

Más particularmente, el puente puede formarse entre las cadenas laterales de los pares de restos 12 y 16, 16 y 20, 17 y 21, 20 y 24, o 24 y 28.. Las dos cadenas laterales pueden unirse entre sí a través de interacciones iónicas, o por enlaces covalentes. Por tanto estos pares de restos pueden comprender cadenas laterales con cargas opuestas para formar un puente salino mediante interacciones iónicas. Por ejemplo, uno de los restos puede ser Glu o Asp, mientras que el otro puede ser Lys o Arg. Los emparejamientos de Lys y Glu y de Lys y Asp también pueden ser capaces de reaccionar para formar un anillo de lactama. Del mismo modo, una Tyr y un Glu o una Tyr y una Asp también pueden formar un anillo de lactona.

En particular, los restos en las posiciones 16 y 20, y/o 2 y 24 pueden formar un puente intramolecular. Como ejemplos de pares de restos adecuados en estas Posiciones se incluyen:

16-Asp, 20-Lys;
16-Glu, 20-Lys;
16-Asp, 20-Arg;
16-Glu, 20-Arg;
16-Lys, 20-Asp;
16-Arg; 20-Asp;
16-Lys, 20-Glu;
16-Arg, 20-Glu; y/o

- 20-Asp, 24-Lys;
20-Glu, 24-Lys;
20-Asp, 24-Arg;
20-Glu, 24-Arg;
5 20-Lys, 24-Asp;
20-Arg, 24-Asp;
20-Lys, 24-Glu;
20-Arg, 24-Glu.
- 10 Sin desear ligarse a ninguna teoría particular, se considera que dichos puentes intramoleculares estabilizan la estructura alfa helicoidal de la molécula y así se aumenta la fuerza y/o la selectividad en el receptor de GLP-1 y posiblemente también en el receptor de glucagón.
- 15 Sin desear ligarse a ninguna teoría particular, los restos de arginina en las posiciones 17 y 18 del glucagón nativo parecen proporcionar selectividad significativa para el receptor de glucagón. Un resto hidrofílico (por ejemplo, Ala) en la posición 18 puede aumentar la potencia tanto del receptor de GLP-1 como el de glucagón.
- 20 La sustitución en la posición 23 (por ejemplo por Ile) puede mejorar la fuerza y/o la selectividad en el receptor de GLP-1.
- 25 Sin desear ligarse a ninguna teoría particular, los restos en las posiciones 27, 28 y 29 del glucagón nativo parecen proporcionar selectividad significativa para el receptor de glucagón. Las sustituciones en una, en dos o en tres de estas posiciones con respecto a la secuencia del glucagón nativo pueden aumentar la fuerza y/o la selectividad para el receptor de GLP-1, posiblemente sin reducción significativa de fuerza en el receptor de glucagón. Como ejemplos particulares se incluyen Glu en la posición 27, Ser en la posición 28 y Ala en la posición 29.
- 30 La sustitución del resto Met de origen natural en la posición 27 (por ejemplo con Leu o Lys, especialmente con Glu) también reduce la posibilidad de oxidación, aumentando así la estabilidad química de los compuestos.
- 35 La sustitución del resto Asn de origen natural en la posición 28 (por ejemplo por Ser, Arg, o Leu) también reduce la posibilidad de desamidación en solución ácida, aumentando así la estabilidad química de los compuestos.
- 40 La fuerza y/o la selectividad en el receptor de GLP-1 también pueden aumentarse introduciendo restos que probablemente forman una estructura helicoidal anfipática, posiblemente sin pérdida significativa de fuerza en el receptor de glucagón. Esto puede conseguirse por introducción de restos cargados en una o más de las posiciones 16, 20, 24 y 28. Por lo tanto todos los restos en las posiciones 16 y 20, pueden estar cargados, todos los restos en las posiciones 16, 20 y 24, pueden estar cargados o todos los restos de las posiciones 16, 20, 24 y 28, pueden estar cargados. Por ejemplo, el resto en la posición 16 puede ser Glu, Lys o Asp. El resto en la posición 20 puede ser Lys, Arg o Glu. El resto en la posición 24 puede ser Glu, Asp, Lys o Arg. El resto en la posición 28 puede ser Arg.
- 45 La sustitución de uno o ambos de los restos de Gln de origen natural en las posiciones 20 y 24 también reduce la posibilidad de desamidación en solución ácida, aumentando así la estabilidad química de los compuestos. El resto de la posición 24 puede ser Glu, Asp, Lys, Arg, Arg o Ala.
- 50 El compuesto puede comprender una secuencia peptídica C-terminal Z de 1-20 aminoácidos, por ejemplo para estabilizar la conformación y/o la estructura secundaria del péptido análogo de glucagón y/o para hacer que el péptido análogo de glucagón sea más resistente a la hidrólisis enzimática, como se describe, por ejemplo, en el documento WO99/46283.
- 55 Cuando está presente, Z representa una secuencia peptídica de 1-20 restos 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 restos de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 restos de aminoácidos, tal como 6 restos de aminoácidos. Cada uno de los restos de aminoácidos en la secuencia peptídica Z puede seleccionarse independientemente 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 restos de aminoácidos se seleccionan de Ser, Thr, Tyr, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn, más preferentemente pueden seleccionarse exclusivamente de Glu, Lys y Cys. Los aminoácidos mencionados anteriormente pueden tener configuración D o L, pero preferentemente tienen configuración L. Particularmente las secuencias Z preferidas son secuencias de cuatro, cinco, seis o siete restos de lisina consecutivos (es decir Lys3, Lys4, Lys5, Lys6 o Lys7), y particularmente de cinco o seis restos de lisina consecutivos. En el documento WO 01/04156 se muestran otras secuencias ejemplares de Z. Como alternativa, el resto C terminal de la secuencia Z puede ser un resto de Cys. Esto puede ayudar en la modificación (por ejemplo, PEGilación) del compuesto. En dichas realizaciones, la secuencia Z puede tener una longitud de, por ejemplo, un solo aminoácido (es decir Z = Cys)
- 65

o puede tener una longitud de dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso más aminoácidos. Por lo tanto los otros aminoácidos actúan como un espaciador entre el péptido X y el resto de Cys terminal.

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

10 El porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia peptídica o polipeptídica determinada con respecto a otra secuencia polipeptídica (por ejemplo, el PI-1) se calcula como el porcentaje de restos de aminoácidos en la secuencia peptídica determinada que son idénticos a los restos 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. Los valores de % de identidad pueden determinarse por WU-BLAST-2 (Altschul et al., Methods in Enzymology, 266: 460- 480 (1996)). WU-BLAST-2 utiliza diversos parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen a valores por defecto. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: tramo de solapamiento =1, fracción de solapamiento = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Un % de identidad de secuencia de aminoácidos se determina por el número de emparejamientos de restos idénticos determinado por WU-BLAST-2, dividido entre el número total de restos de la secuencia de referencia (ignorándose los huecos introducidos por WU-BLAST-2 en la secuencia de referencia para maximizar la puntuación del alineamiento), multiplicado por 100.

20 Por tanto, cuando la secuencia Z se alinea óptimamente con los 8 aminoácidos del PI-1, esta no tiene más de dos aminoácidos que sean idénticos a los aminoácidos correspondientes del PI-1.

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

30 Sin desear ligarse a ninguna teoría particular, se piensa que el sustituyente lipófilo se une a la albúmina en la corriente sanguínea, protegiendo así a los compuestos de la invención de la degradación enzimática lo cual puede potenciar la semivida de los compuestos. El espaciador, cuando está presente, se usa para proporcionar una separación entre el compuesto y el sustituyente lipófilo.

35 El sustituyente lipófilo puede unirse a la cadena lateral de aminoácidos o al espaciador mediante un éster, un sulfonil éster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. Por consiguiente se entenderá que, preferentemente, el sustituyente lipófilo incluye un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S que forma parte del éster, sulfonil éster, tioéster, amida o sulfonamida. Preferentemente, un grupo acilo en el sustituyente lipófilo forma parte de una amida o un éster con la cadena lateral de aminoácidos o el espaciador.

40 El sustituyente lipófilo puede incluir una cadena hidrocarbonada que tenga 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 hidrocarbonada puede ser lineal o ramificada y puede estar saturada o insaturada. Se entenderá que la cadena hidrocarbonada está preferentemente sustituida con un resto que forma parte de la unión con la cadena lateral de aminoácidos o el 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 hidrocarbonada está sustituida con acilo, y por consiguiente la cadena hidrocarbonada puede ser parte de un grupo alcanóilo, por ejemplo palmitoílo, caproílo, lauroílo, miristoílo o estearoílo.

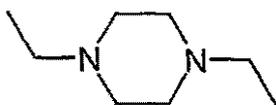
Por consiguiente, el sustituyente lipófilo puede tener la fórmula mostrada a continuación:



Y 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.

55 La cadena hidrocarbonada puede estar adicionalmente sustituida. Por ejemplo, puede estar adicionalmente sustituida con hasta tres sustituyentes seleccionados de NH₂, OH y COOH. Si la cadena hidrocarbonada está adicionalmente sustituida, de manera preferente se sustituye adicionalmente con un solo sustituyente. Como alternativa o adicionalmente, la cadena hidrocarbonada puede incluir un cicloalcano o un heterocicloalcano, por ejemplo, como se muestra a continuación:

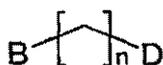
60



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

5 Como alternativa, el sustituyente lipófilo puede basarse en un esqueleto de ciclopentanofenantreno, que puede estar parcial o complemente insaturado, o saturado. Cada uno de los átomos de carbono en el esqueleto puede sustituirse 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 conjugarse con la cadena lateral de aminoácidos mediante 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 la cadena lateral de aminoácidos independientemente por un éster, un sulfonyl éster, un tioéster, una amida o una sulfonamida. Por consiguiente, puede incluir dos restos seleccionados independientemente de acilo, sulfonyl, un átomo de N, un
15 átomo de O o un átomo de S. El espaciador puede tener la fórmula:



20 en la que cada uno de B y D se seleccionan independientemente de acilo, sulfonyl, NH, N-alkilo, 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 sustituirse adicionalmente con uno o más sustituyentes seleccionados de alquilo C₁₋₆, alquilamina C₀₋₆, hidroxialquilo C₀₋₆ y carboxialquilo C₀₋₆.

25 Como alternativa, el espaciador puede tener dos o más unidades de repetición de la fórmula anterior. Cada una de B, D y n se selecciona independientemente para cada unidad de repetición. Las unidades de repetición adyacentes pueden unirse covalentemente entre sí mediante sus restos B y D respectivos. Por ejemplo, los restos B y D de las unidades de repetición adyacentes pueden formar conjuntamente un éster, un sulfonyl éster, 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 al sustituyente lipófilo como se ha descrito anteriormente.

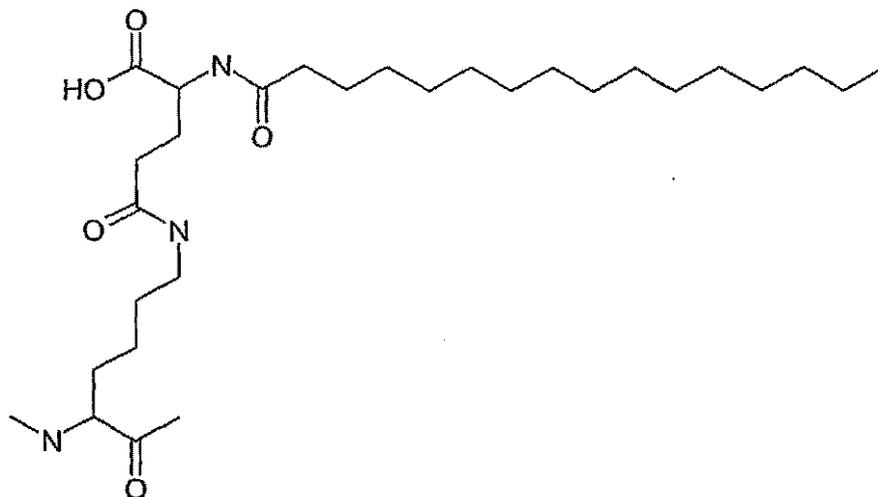
30 Preferentemente, el espaciador tiene cinco o menos, cuatro o menos o tres o menos unidades de repetición. Más preferentemente el espaciador tiene dos unidades de repetición, o es una sola unidad.

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

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

45 El sustituyente lipófilo puede conjugarse con cualquier cadena lateral de aminoácidos en los compuestos de la invención. Preferentemente, la cadena lateral de aminoácidos incluye un grupo carboxi, hidroxilo, tiol, amida o amina para formar un éster, un sulfonyl éster, un tioéster, una amida o una sulfonamida con el espaciador o sustituyente lipófilo. Por ejemplo, el sustituyente lipófilo puede conjugarse con Asn, Asp, Glu, Gln, His, Lys, Arg, Ser, Thr, Tyr, Trp, Cys o Dbu, Dpr u Orn. Preferentemente, el sustituyente lipófilo se conjuga con Lys. Sin embargo, cualquier aminoácido mostrado como Lys en las fórmulas proporcionadas en el presente documento puede reemplazarse por
50 Dbu, Dpr u Orn donde se añade un sustituyente lipófilo.

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



5 Aquí, una Lys del compuesto de la presente invención está unida covalentemente a γ -Glu (el espaciador) mediante un resto amida. El palmitoilo está unido covalentemente al espaciador γ -Glu mediante un resto amida. Como alternativa, o de manera adicional, una o más cadenas laterales de aminoácidos en el compuesto de la invención pueden conjugarse con un resto polimérico, para aumentar, por ejemplo, la solubilidad y/o la semivida *in vivo* (por ejemplo en plasma) y/o la biodisponibilidad. También se sabe que dicha modificación reduce la eliminación (por ejemplo, eliminación renal) de proteínas y péptidos terapéuticos.

10 El resto polimérico es preferentemente soluble en agua (anfífilo o hidrófilo) no tóxico, y farmacéuticamente inerte. Los restos poliméricos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), homo- o copolímeros de PEG, un polímero de PEG monometil sustituido (mPEG), o polioxietilenglicol (POG). Véase, por ejemplo, *Int. J. Hematology* 68: 1 (1998); *Bioconjugate Chem.* 6: 150 (1995); y *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 9: 249 (1992).

15 Otros restos poliméricos adecuados incluyen poliaminoácidos tales como polilisina, ácido poliaspártico y ácido poliglutámico (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).

20 El resto polimérico puede ser una cadena lineal o ramificada. Puede tener un peso molecular de 500- 40.000 Da, por ejemplo 500-10.000 Da, 1000- 5000 Da, 10.000- 20.000 Da o 20.000- 40.000 Da.

25 Un compuesto puede comprender dos o más de dichos restos, en cuyo caso el peso molecular total de todos dichos restos se encontrará generalmente en los intervalos proporcionados anteriormente.

El resto polimérico puede acoplarse (por enlace covalente) a un grupo amino, carboxilo o tiol de una cadena lateral de aminoácidos. Son ejemplos preferidos el grupo tiol de los restos de Cys y el grupo amino épsilon de los restos de Lys y también pueden usarse los grupos carboxilo de los restos de Asp y Glu.

30 El lector experto será consciente de técnicas adecuadas que pueden usarse para realizar la reacción de acoplamiento. Por ejemplo, un resto de PEG que lleve un grupo metoxi puede acoplarse con un grupo tiol de Cys mediante un enlace de maleimido usando reactivos disponibles en el mercado de Nektar Therapeutics AL. Véase también el documento WO 2008/101017, y las referencias citadas anteriormente para detalles de química adecuada.

35 Síntesis peptídica

Los compuestos de la presente invención pueden fabricarse mediante métodos sintéticos convencionales, sistemas de expresión recombinante, o mediante cualquier otro método del campo técnico. De este modo, los análogos de glucagón pueden sintetizarse de diversas maneras incluyendo, por ejemplo, un método que comprenda:

40 (a) sintetizar el péptido por metodología de fase sólida o de fase líquida bien gradualmente o por ensamblaje de fragmentos y aislar y purificar el producto peptídico final;

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

(c) efectuar la expresión *in vitro* acelular de una construcción de ácido nucleico que codifique el péptido y recuperar el producto de expresión;

o cualquier combinación de los métodos 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 mediante síntesis peptídica en fase sólida o fase líquida. En este contexto, se hace referencia al documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, Fields, GB et al., 2002, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis". In: Synthetic Peptides (2ª Edición) y los Ejemplos en su interior.

10 Para la expresión recombinante, los fragmentos de ácido nucleico de la invención normalmente se insertarán en vectores adecuados para formar vectores de clonación o de expresión que lleven los fragmentos de ácido nucleico de la invención; dichos nuevos vectores también forman parte de la invención. Los vectores pueden, dependiendo de la finalidad y del tipo de aplicación, estar en forma de plásmidos, fagos, cósmidos, mini-cromosomas, o virus, aunque también es un vector importante un ADN desnudo que solo se exprese transitoriamente en determinadas células. Los vectores de clonación y de expresión (vectores plasmídicos) preferidos de la invención pueden replicarse de manera autónoma, facilitando de este modo grandes cantidades de copias con objeto de obtener una expresión a alto nivel o una replicación a alto nivel para la clonación posterior.

20 En líneas generales, un vector de expresión comprende las siguientes características en dirección 5'→3' y en unión operativa: 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 facilita la secreción (en la fase extracelular o, cuando sea aplicable, en el periplasma), el fragmento de ácido nucleico que codifica el péptido de la invención y opcionalmente una secuencia de ácido nucleico que codifica un terminador. Este puede comprender características adicionales tales como marcadores de selección y orígenes de replicación. Cuando se opera con vectores de expresión en cepas o líneas celulares productoras puede preferirse que el vector pueda integrarse en el genoma de la célula hospedadora. El experto en la técnica está muy familiarizado con vectores de expresión y es capaz de diseñar uno de acuerdo con sus necesidades específicas.

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

35 Los microorganismos, tales como bacterias (tal como, especies de *Escherichia* (por ejemplo *E. coli*), de *Bacillus* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*), de *Salmonella*, o de *Mycobacterium* (preferentemente no patógeno, por ejemplo, el BCG de *M. bovis*), levaduras (tal como, *Saccharomyces cerevisiae*) y protozoos, son células transformadas preferidas de la invención. Como alternativa, las células transformadas pueden derivar de un organismo multicelular, es decir, puede ser una célula fúngica, una célula de insecto, una célula vegetal o una célula de mamífero. Para los fines de clonación y/o expresión optimizadas se prefiere que la célula transformada pueda replicarse en el fragmento de ácido nucleico de la invención. Las células que expresan el fragmento de ácido nucleico son realizaciones útiles de la invención; estas pueden usarse para preparar, a pequeña o gran escala, los péptidos de la invención.

Cuando el péptido de la invención se produce mediante células transformadas, es conveniente, aunque lejos de ser esencial, que el producto de expresión se segregue en el medio de cultivo.

45 Eficacia

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

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

65 Los valores de CE₅₀ pueden usarse como una medición numérica de la fuerza agonista en un receptor determinado. Un valor de CE₅₀ es una medición de la concentración de un compuesto necesaria para conseguir la mitad de la

actividad máxima del compuesto en un ensayo particular. Por tanto, por ejemplo, un compuesto que tiene un valor de CE₅₀[GLP-1] inferior que el CE₅₀[GLP-1] del glucagón nativo en un ensayo particular puede considerarse que tiene una mayor potencia en el GLP-1 que el glucagón.

- 5 Los compuestos descritos en la presente memoria descriptiva son normalmente agonistas dobles Glu-GLP-1, es decir, son capaces de estimular la formación de AMPc tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GLP-1. La estimulación de cada receptor puede medirse en ensayos independientes y después de esto compararse entre sí.
- 10 Mediante la comparación del valor de CE₅₀ para el receptor de glucagón (CE₅₀ [Glucagón-R]) con el valor de CE₅₀ para el receptor de GLP-1, (CE₅₀ [GLP-1R]) para un compuesto determinado puede encontrarse que la selectividad de glucagón relativa (%) de ese compuesto es:

15 **Selectividad de Glucagón-R Relativa [Compuesto] = (1/CE₅₀ [Glucagón-R])x100 / (1/CE₅₀ [Glucagón-R] + 1/CE₅₀ [GLP-1 R])**

La selectividad de GLP-1 R relativa puede por tanto encontrarse:

20 **Selectividad de GLP-1 R relativa [Compuesto] = (1/CE₅₀ [GLP-1 R])x100 / (1/CE₅₀ [Glucagón-R] + 1/CE₅₀ [GLP-1 R])**

La selectividad relativa de un compuesto permite comparar su efecto sobre el receptor de glucagón o GLP-1 directamente con su efecto sobre el otro receptor. Por ejemplo, cuanto mayor es la selectividad de GLP-1 relativa de un compuesto, mayor es la eficacia del compuesto sobre el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón.

Usando los ensayos descritos a continuación, se ha encontrado que la selectividad de GLP-1 relativa para el glucagón humano es aproximadamente de 5 %.

- 30 Los compuestos de la invención tienen una selectividad de GLP-1 R relativa más elevada en comparación con glucagón humano. Por tanto, para un nivel particular de actividad agonista de glucagón-R, el compuesto presentará un nivel más alto de actividad agonista de GLP-1 R (es decir, una mayor fuerza en el receptor de GLP-1) que el glucagón. Se entenderá que la fuerza absoluta de un compuesto particular en los receptores de glucagón y GLP-1 puede ser mayor, menor o aproximadamente igual que la del glucagón humano nativo, siempre que se consiga la selectividad de GLP-1 R relativa apropiada.

40 Sin embargo, los compuestos de la presente invención pueden tener un valor de CE₅₀ [GLP-1 R] inferior con respecto al glucagón humano. Los compuestos pueden tener un valor de CE₅₀ [GLP-1-R] inferior con respecto al glucagón mientras que al mismo tiempo se mantiene una CE₅₀ [Glucagón-R] que es menor que 10 veces mayor que la del glucagón humano, menor que 5 veces mayor que la del glucagón humano o menor que 2 veces mayor que la del glucagón humano.

45 Los compuestos de la invención pueden tener una CE₅₀ [Glucagón-R] que sea menor que dos veces la del glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE₅₀ [Glucagón-R] que es menor que dos veces la del glucagón humano y tener una CE₅₀ [GLP-1 R] que es menor que la mitad de la de glucagón humano, menor que una quinta parte de la de glucagón humano o menor que una décima parte de la del glucagón humano.

50 La selectividad de GLP-1 relativa de los compuestos puede estar 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

55 Los compuestos de la invención pueden proporcionar una opción de tratamiento atractiva para la obesidad y enfermedades metabólicas que incluyen la diabetes de tipo 2.

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

60 Los niveles de glucemia se controlan por la hormona insulina que se produce 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 insulina (en diabetes gestacional) seguido por la pérdida de células beta (en la diabetes de tipo 2). Ambos tipos de diabetes conducen a hiperglucemia, que produce en gran medida los síntomas agudos de la diabetes: producción de orina excesiva, dando como resultado sed compensatoria y un aumento de la ingesta de fluidos, visión borrosa, pérdida de peso inexplicable, letargo y cambios en cuanto al

metabolismo energético.

El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólicos en una persona. Los mismos incluyen obesidad abdominal (tejido adiposo excesivo alrededor de los órganos internos abdominales), dislipidemia aterogénica (trastornos adiposos en sangre que incluyen altos valores de triglicéridos, colesterol HDL bajo y/o colesterol LDL alto, que fomentan la acumulación de placa en paredes arteriales), presión arterial elevada (hipertensión), resistencia a insulina e intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (por ejemplo altos niveles de fibrinógeno o de inhibidor de activador de plasminógeno-1 en sangre) y estado proinflamatorio (por ejemplo, proteína C reactiva elevada en la sangre).

Los individuos con síndrome metabólico tienen un riesgo aumentado de diabetes de tipo 2 así como de cardiopatía coronaria y otras enfermedades relacionadas a otras manifestaciones de aterosclerosis (por ejemplo, ictus y enfermedad vascular periférica) así como la diabetes de tipo 2. Los factores de riesgo subyacentes dominantes de este síndrome parecen ser obesidad abdominal y resistencia a insulina. La resistencia a insulina es un trastorno metabólico generalizado, en el que el cuerpo es incapaz de usar la insulina eficientemente.

Sin el deseo de limitarse a ninguna teoría particular, se piensa que los compuestos de la invención actúan como agonistas de GluGLP-1 dobles. El agonista doble combina el efecto del glucagón sobre el metabolismo de las grasas con los efectos del GLP-1 sobre los niveles de glucemia y la ingesta de alimento. Los mismos podrían actuar por lo tanto de una manera sinérgica para acelerar la eliminación de un depósito de grasas excesivo, inducir la pérdida de peso sostenible y disminuir directamente los niveles de glucosa mórbidos a niveles normales sin el riesgo de hipoglucemia, que está asociada con el uso simultáneo de los agonistas de GLP-1 y la sulfonilurea.

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

Los compuestos de la presente invención pueden por lo tanto usarse como agentes farmacéuticos para prevenir el aumento de peso, promover la pérdida de peso, reducir el exceso de peso corporal o tratar la obesidad (por ejemplo controlando el apetito, la alimentación, la ingesta de alimento, la ingesta de calorías y/o el gasto energético), incluyendo obesidad mórbida, así como enfermedades y afecciones asociadas que incluyen pero sin limitación inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula relacionada con obesidad y la apnea del sueño inducida por obesidad. Los compuestos de la invención también pueden usarse para el tratamiento del síndrome metabólico, resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria e ictus. Todas estas son afecciones que pueden estar asociadas con la obesidad. Sin embargo, los efectos de los compuestos de la invención sobre estas afecciones pueden mediarse totalmente o en parte mediante un efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

Composiciones farmacéuticas

Los compuestos de la presente invención, o sales de los mismos, pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para el 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.

La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, del tipo de mamífero que se esté tratando y de las características físicas del mamífero específico que se está considerando. Estos factores y sus relaciones para determinar esta cantidad son bien conocidos por los médicos expertos en la técnica médica. Esta cantidad y el método de administración pueden ajustarse a medida para conseguir la eficacia óptima y pueden depender de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores bien conocidos por los expertos en la técnica de la medicina. Los tamaños de dosificación y el régimen de dosificación más apropiados para el uso humano pueden estar guiados por los resultados obtenidos por la presente invención y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados apropiadamente.

Una dosificación y un protocolo de tratamiento eficaces pueden determinarse mediante medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y después aumentando la dosificación controlando al mismo tiempo los efectos y variando también sistemáticamente el régimen de dosificación. Numerosos factores pueden tomarse en cuenta por un médico cuando se determina una dosificación óptima para un sujeto determinado. Dichas consideraciones son conocidas por el experto en la técnica.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para el 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, puede usarse solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a

un pH ligeramente ácido o fisiológico. Los agentes tampón de pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris/hidroximetil) amino metano (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. El término incluye adicionalmente cualquiera de los agentes indicados en la Farmacopea de Estados Unidos para su uso en animales, incluyendo 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. Como ejemplos de sales de adición de ácido se incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Como ejemplos de sales básicas se incluyen sales en las que el catión se selecciona entre metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio e iones de amonio $^+N(R^3)_3(R^4)$, donde R^3 y R^4 designan independientemente alquilo C_{1-6} sustituidos opcionalmente, alqueno C_{2-6} sustituidos opcionalmente, arilo sustituido opcionalmente o heteroarilo sustituido opcionalmente. 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, EE.UU., 1985 y ediciones más recientes, y en la Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology.

“Tratamiento” es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de la presente invención, un resultado clínico beneficioso o deseado incluye, pero sin limitación, el alivio de los síntomas, la disminución del alcance de enfermedad, estado de la enfermedad estabilizado (es decir, no empeoramiento), retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o alivio de la patología y remisión (parcial o total), detectable o no detectable. “Tratamiento” también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. El “tratamiento” es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o modificar la patología de un trastorno. Por consiguiente, “tratamiento” se refiere a un tratamiento tanto terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas. Los que requieren tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como aquellos en los que se tiene que 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 apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades individuales de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, oblea o un propio comprimido o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Puede proporcionarse en una forma inyectable monodosis, por ejemplo en forma de un bolígrafo. Las composiciones pueden formularse para cualquier vía y medio de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen aquellos usados en formulaciones adecuadas para la administración oral, rectal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo administración subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica o transdérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

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

Terapia de combinación

Los compuestos de la invención pueden administrarse 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 pueden proporcionarse 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) puede usarse en combinación con un agente antidiabético que incluye pero sin limitación 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 conseguir 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 insulina para conseguir un control glucémico adecuado. Como ejemplos de análogos de insulina se incluyen pero sin limitación Lantus, Novorapid, Humalog, Novomix y Actraphane HM.

El compuesto o sal del mismo puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad que incluye pero sin limitación un agonista del receptor del péptido 1 similar a glucagón, un péptido YY o análogo del mismo, un antagonista del receptor canabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina o un antagonista del receptor de la hormona concentradora de melanina 1.

El compuesto análogo o sal del mismo puede usarse en combinación con un agente antihipertensión incluyendo, pero sin limitación, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueante del receptor de

angiotensina II, diuréticos, un beta bloqueante o un bloqueante de los canales de calcio.

Métodos

5 Síntesis general de análogos de glucagón

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

Escisión:

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

20 Síntesis general de los análogos de glucagón acilados

La estructura peptídica se sintetizó como se ha descrito anteriormente para la síntesis general de los análogos de glucagón, con la excepción de que está acilada en la cadena lateral de un resto de lisina con el péptido aún unido a la resina y completamente protegido en los grupos de la cadena lateral, excepto en la amina épsilon en la lisina a acilar. La lisina a acilar se incorpora con el uso de Fmoc-Lys (ivDde)-OH. El extremo N del péptido se protegió con un grupo Boc usando Boc₂O en NMP. Mientras el péptido está aún unido a la resina, el grupo protector ivDde se escinde selectivamente usando hidrato de hidracina al 2 % en NMP. Posteriormente, la cadena lateral de lisina no protegida se acopla primero con un aminoácido espaciador como Fmoc-Glu-OtBu, que se desprotege con piperidina y se acila con un ácido graso usando una metodología de acoplamiento peptídico convencional 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 a partir de la resina y purificación se realizan como se ha descrito anteriormente.

Análisis de estabilidad peptídica

- 35 Los análogos de glucagón se incubaron como compuestos sólidos a 40 °C y se disolvieron como soluciones en HCl acuoso 0,1 M (2 mg/ml). Las soluciones se incubaron a 40 °C. Los análogos de glucagón intactos restantes se midieron a RP-HPLC por integración de la señal UV a 220 nm. El porcentaje restante es una medida de la estabilidad relativa.
- 40 El sólido y las soluciones de los compuestos de glucagón se diluyeron antes del análisis en disolvente de HPLC a una concentración de 0,2 mg/ml y se analizaron en momentos apropiados.

Tabla 1. Configuración de HPLC analítica.

Columna	Gemini C18 150x3 mm
Gradiente (tiempo; % de 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	TFA al 0,1 % en MeCN:MQW al 1 %
Disolvente B	TFA al 0,085 % en MeCN
Flujo	0,300 ml/min
Volumen de Inyección	35 µl
Temperatura de la Columna	30 °C
Detección UV	220 nm

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

El ADNc que codifica el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) (número de acceso primario P47871) o el receptor de péptido 1 similar a glucagón humano (GLP-1-R) (número de acceso primario P43220) se clonaron a partir de los clones de ADNc BC104854 (MGC: 132514/IMAGE: 8143857) y 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' adicionalmente codificaron una secuencia consenso Kozak cercana para garantizar la traducción eficaz. La fidelidad del ADN que codifica el Glucagón-R y el GLP-1-R se confirmó mediante secuenciación de ADN. Los productos de PCR que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se subclonaron en un vector de expresión de mamífero que contenía un marcador de resistencia a neomicina (G418).

Los vectores de expresión de mamíferos que codifican el Glucagón-R o el GLP-1-R se transfectaron en células HEK293 mediante un método de transfección con fosfato de calcio convencional. 48 horas después de la transfección las células se sembraron para una clonación a dilución limitada y se seleccionaron con 1 mg/ml de G418 en el medio de cultivo. Tres semanas después 12 colonias supervivientes de células que expresaban Glucagón-R y GLP-1-R se seleccionaron, se propagaron y se sometieron a ensayo en los ensayos de eficacia de Glucagón-R y GLP-1-R como se describe más adelante. Un clon que expresa Glucagón-R y un clon que expresa GLP-1-R se seleccionaron para realizar la creación de perfil del compuesto.

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

Se sembraron células HEK293 que expresaban el Glucagón-R o el GLP-1-R humano a 40.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos recubiertas con poli-L-lisina al 0,01 % y se cultivaron durante 1 día en cultivo en 100 µl de medio de cultivo. El día del análisis, el medio de cultivo se eliminó y las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón Tyrode. Las células se incubaron en 100 µl de tampón Tyrode que contenía concentraciones crecientes de péptidos de ensayo, IBMX 100 µM y glucosa 6 mM durante hasta 15 min a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 25 µl de HCl 0,5 M y se incubó en hielo durante 60 minutos. El contenido de AMPc se calculó usando el kit de AMPc FlashPlate® de Perkin-Elmer. El valor de CE₅₀ y las eficacias relativas en comparación con los compuestos de referencia (glucagón y GLP-1) se estimó mediante un ajuste de curva con ayuda de un ordenador.

Lipólisis en adipocitos de rata primarios

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

Ensayo de tolerancia a glucosa oral (OGTT) en ratones db/db

Ratones db/db se dejaron en ayunas durante una noche y se extrajo una muestra de sangre inicial (nivel de glucemia en ayunas) antes de la administración (i.p.) de vehículos (tampón acetato 20 mM, ácido acético 250 mM, manitol pH 5,0) o los compuestos del ensayo a (5 ml/kg, i.p.) exendina-4 (0,56, 1,67 y 5,0 nmol/kg en PBS) y ZP2663 (SEC ID N°: 4) (5 y 45 nmol/kg en tampón acetato). Los animales se mantuvieron en ayunas durante el experimento para impedir la confusión de ingesta de alimento. Cincuenta minutos más tarde se administró una dosis oral de glucosa (1 g/kg en 5 ml/kg) y los niveles de glucemia (G) se midieron a t=30 min, t=60 min, t=120 min y t=240 min.

La diferencia desde la línea basal (t=0) se calculó para cada momento y se determinaron los valores de ABC_{0-240 min}. Se realizaron análisis estadísticos de valores de ABC mediante ANOVA de una vía y análisis post-hoc de Dunnetts con la versión 4 de GraphPad Prism. Las diferencias se consideraron significativas a un nivel de p < 0,05.

Ingesta de alimento en ratones normales

Una semana antes del estudio se condicionó a ratones C57Bl/6 (8 semanas) (n=9-12 animales en cada grupo) para el tratamiento mediante inyecciones diarias (s.c.) de 0,2 ml de vehículo y se aclimataron para el manejo pesándolos dos veces a la semana. Los ratones se estratificaron un día antes de comenzar el experimento en grupos con peso corporal (PC) similar. Los grupos de ratones estratificados ayunaron durante toda la noche y se trataron con (10 µl de solución de ensayo/g PC, s.c.) con PYY₃₋₃₆ (30 nmol/kg) (control positivo interno), glucagón (500 nmol/kg) ZP2663 (SEC. ID. N°: 4) (500 nmol/kg) o vehículo (PBS). Después de una hora se introdujo alimento pesado previamente y se midió la ingesta de alimento pesando el alimento restante después de una hora y se expresó en relación al peso corporal (mg de alimento/g PC). Los análisis estadísticos de los datos de la ingesta de alimento por ANOVA de una

vía y los análisis post-hoc de Dunnett se realizaron con la versión 4 de GraphPad Prism. Las diferencias se consideraron significativas al nivel de 0,05.

5 Efectos de tratamiento de 28 días de ratones obesos inducidos por la dieta (DIO) con GLP-1 y el agonista doble de GluGLP-1 sobre de peso corporal y colesterol en plasma

10 Cuatro semanas antes de los tratamientos con los fármacos, ratones macho C57Bl/6 (7 semanas) (N=9-12 animales en cada grupo) se pusieron en una dieta rica en grasas (DRG) y su ciclo día-noche se invirtió con luces apagadas/encendidas a 20/8 horas. Los animales experimentales se acondicionaron para el tratamiento mediante inyecciones diarias (s.c.) de 0,1 ml de vehículo y se aclimataron a la manipulación pesándolos dos veces a la semana una semana antes de comenzar las administraciones de fármaco. El día antes de comenzar el experimento, los ratones se estratificaron en grupos con peso corporal similar (PC) y al siguiente día los grupos se estratificaron en ratones tratados (d.v.s.; s.c.) con ZP2663 (SEC ID N°: 4) (500 nmol/kg) o vehículos (tampón acetato 20 mM, ácido acético 250 mM, Manitol 250 mM, pH 5,0). Se dieron oxintomodulina y exendina 4 en soluciones de PBS (pH 15 7,4, 2,5 µl/g PC), mientras que se dio ZP2663 (SEC ID N°: 4) en tampón acetato isotónico (pH 4,8; 2,5 µl/g PC). Un grupo de control no obeso mantenido con un pienso regular se trató con vehículo en el mismo régimen de tratamiento que los grupos DIO. Se registraron los pesos corporales diariamente y se usaron para administrar las dosis corregidas para peso corporal del péptido a lo largo del estudio. Los animales se mantuvieron en ayunas durante una noche antes del sacrificio. Se obtuvo una muestra de sangre ocular (0,6 ml EDTA) a la mañana siguiente inmediatamente antes de la dislocación cervical. Las muestras de plasma sanguíneo se conservaron a -80 20 °C hasta que se analizaron para colesterol, HDL y LDL usando kits disponibles en el mercado. El aumento de peso corporal a lo largo del periodo de tratamiento se calculó para cada animal restando su peso al inicio del tratamiento.

25 Los efectos del tratamiento en el aumento del peso corporal y en los colesterolos se evaluaron mediante ANOVA de dos vías con medidas repetitivas y análisis post-hoc de Bonferoni, usando la versión 4 de GraphPad Prism. Las diferencias se consideraron significativas al nivel de 0,05. **Resultados**

Ejemplo 1: Estabilidad peptídica

30

Tabla 2. Estabilidad peptídica

Compuesto ZP	Recuperación (%) péptido sólido	Recuperación (%)HCl 0,1 M
Glucagón	91	15
2663	95	71

Ejemplo 2: Eficacia sobre los receptores de glucagón y de GLP-1*Tabla 3. Valores de CE50 de los receptores de Glucagón y de GLP-1*

		GLP-1R CE ₅₀ (nmol)	GLUR CE ₅₀ (nmol)
Glucagón		2,0	0,10
OXM		1,0	0,50
Exendina-4		0,02	>1.000
ZP2663 (SEC ID N°: 4)	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA-NH2	0,06	0,06
L006-0082 (SEC ID N°: 5)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA-NH2	0,09	0,12
L006-0083 (SEC ID N°: 6)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFVEWLLSA-NH2	0,08	0,12
L006-0084 (SEC ID N°: 7)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQWLLSA-NH2	0,07	0,13
L006-0090 (SEC ID N°: 8)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFIEWLLSA-NH2	0,15	0,22
L006-0093 (SEC ID N°: 9)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRARDFIDWLLSA-NH2	0,07	0,10
L006-0094 (SEC ID N°: 10)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDKRAEDFIKWLLSA-NH2	0,16	0,25
L006-0128 (SEC ID N°: 11)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIRWLLSA-NH2	0,16	0,22
L006-0138 (SEC ID N°: 12)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLRA-NH2	0,29	0,38
L006-0081 (SEC ID N°: 13)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDSRRAKDFIEWLLSA-NH2	0,14	0,23
L006-0108 (SEC ID N°: 14)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLLSA-NH2	0,53	0,81
L006-0129 (SEC ID N°: 15)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIDWLLSA-NH2	0,20	0,24
L006-0136 (SEC ID N°: 16)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLAA-NH2	0,22	0,33
L006-0295 (SEC ID N°: 17)*	H-HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA-OH	0,28	0,12

5

Los compuestos marcados con “*” son péptidos brutos con una pureza de menos de 90 %. El valor de CE50 se corrige a una pureza del 50 %.

Ejemplo 3: Ensayo de lipólisis

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

Compuesto	CE50 (nM)
Exendina-4	Sin efecto
Glucagón	6
OXM	180
ZP2663 (SEC ID N°: 4)	3,6

5 Exendina-4 y OXM tuvieron poco o ningún efecto sobre la lipólisis en cultivos de adipocitos primarios, ZP2663 (SEC ID N°: 4) tuvo la misma potencia que glucagón y fue 40 veces más potente que OXM. El hallazgo de que 4 semanas de tratamiento de ratones DIO con ZP2663 (SEC ID N°: 4) disminuyó significativamente el depósito de grasa coincide con el efecto (Tabla 4) observado sobre el metabolismo de lípidos en cultivos de adipocitos primarios.

10 **Ejemplo 4: Efecto sobre la tolerancia a la glucosa oral en ratones db/db**

ZP2663 (SEC ID N°: 4) mejoró significativamente la tolerancia a la glucosa medida durante una OGTT en ratones db/db diabéticos (Fig. 1). ZP2663 (SEC ID N°: 4) mejoró la tolerancia a la glucosa en el 64,9 % a 45 nmol/kg.

15 **Ejemplo 5: Efecto en la ingesta de alimento en ratones**

Los animales tratados con vehículo ingirieron $0,033 \pm 0,001$ g de alimento/g peso corporal durante la primera hora (Fig.2). PYY(3-36) mostró un efecto un efecto anoréxico tal como se esperaba a partir de hallazgos anteriores. ZP2663 (SEC ID N°: 4) (500nmol/kg) disminuyó significativamente la ingesta de alimento durante la primera hora
20 siguiente a la inyección del péptido (Fig.2). El glucagón no tuvo ningún efecto en la ingesta de alimento.

Ejemplo 6: Efecto de la administración subcutánea sobre el aumento del peso corporal en ratones obesos inducidos por dieta

25 ZP2663 (SEC ID N°: 4) disminuyó el aumento de peso corporal a un nivel similar al observado con alimentación con pienso (Fig. 3). El aumento de peso corporal fue estadísticamente significativamente menor que el grupo de vehículo.

30 **Ejemplo 7: Efectos sobre LDL y HDL**

La exendina-4 es un agonista de GLP-1R muy potente, pero no tiene ningún efecto sobre GluR y no tiene efecto en el ensayo de lipólisis de adipocitos de rata descrito anteriormente. Además exendina-4 no tiene efecto sobre las concentraciones del colesterol total, HDL, LDL o proporciones HDL/LDL en sangre (Figs. 3, 4)

35 Por otro lado, el tratamiento de los ratones DIO con ZP2663 (SEC ID N°: 4) tuvo un efecto significativo en la concentración de colesterol LDL ($P=0,0001$) así como en las tasas HDL/LDL ($P= 0,0006$) en comparación con el vehículo (Figs. 4, 5).

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula $R^1-X-Z-R^2$
 en la que
 5 R^1 es H, alquilo C₁₋₄, acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;
 R^2 es OH o NH₂;
 X es un péptido que tiene la fórmula I:
- 10 His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Ile-Glu-
 Trp-Leu-Leu-Ser-Ala (SEC ID N^o: 4)
- o difiere de la fórmula I hasta en 4 de las siguientes posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:
- 15 el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;
 el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys, Arg;
 el resto en la posición 18 es: Ala;
 el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu, Asp;
 el resto en la posición 21 es: Glu;
 el resto en la posición 23 es: Val;
- 20 el resto en la posición 24 se selecciona de: Gln, Asp, Lys, Arg, Ala;
 el resto en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Lys;
 el resto en la posición 28 se selecciona de: Asn, Arg, Lys, Ala, Glu, Asp;
- 25 y Z está ausente o es una secuencia de 1-20 unidades de aminoácidos 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.
2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que X difiere de la fórmula I hasta en 4 de las siguientes
 30 posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:
- el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;
 el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys;
 el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu;
 el resto en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Lys; y
 35 el resto en la posición 28 se selecciona de: Asn, Arg, Ala.
3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2 en el que X difiere de la fórmula I hasta en 3 de las siguientes
 40 posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:
- el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;
 el resto en la posición 16 se selecciona de: Arg, Asp, Lys; y
 el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu.
4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que X difiere de la fórmula I hasta en 4 de las siguientes
 45 posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:
- el resto en la posición 2 se selecciona de: D-Ser, Aib;
 el resto en la posición 16 se selecciona de: Ser, Asp, Lys;
 el resto en la posición 18 es: Ala; y
 50 el resto en la posición 20 se selecciona de: Gln, Arg, Glu.
5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que el péptido X difiere de la fórmula I hasta en 4 de las
 siguientes posiciones, por lo cual, si es diferente de la fórmula I:
- 55 el resto en la posición 23 es: Val;
 el resto en la posición 24 se selecciona de: Gln, Asp, Lys, Arg, Ala;
 el resto en la posición 27 se selecciona de: Met, Cys, Lys; y
 el resto en la posición 28 se selecciona de: Asn, Arg, Ala.
- 60 6. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que los restos en las
 posiciones 16 y 20, y/o 20 y 24 son capaces de formar un puente salino.
7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que X comprende uno o
 65 más de los siguientes grupos de restos:
- 20-Lys, 24-Glu;

- 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu;
 16-Glu, 20-Lys, 24-Glu;
 16-Glu, 20-Lys;
 16-Glu, 20-Lys, 29-Ala;
 5 16-Glu, 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu;
 20-Lys, 23-Ile, 24-Glu;
 27-Leu, 28-Ser, 29-Ala;
 16-Ser;
 20-Gln;
 10 23-Val;
 24-Gln;
 16-Ser, 20-Gln;
 16-Asp, 20-Arg, 24-Asp;
 16-Lys, 20-Glu;
 15 24-Arg; o
 28-Arg.

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1 en el que X tiene la secuencia:

- 20 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 13);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA (SEC ID N°: 5);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 6);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIQWLLSA (SEC ID N°: 7);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFIEWLLSA (SEC ID N°: 8);
 25 HSQGTFTSDYSKYLDERRARDFIDWLLSA (SEC ID N°: 9);
 HSQGTFTSDYSKYLDKRAEDFIKWLLSA (SEC ID N°: 10);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIRWLLSA (SEC ID N°: 11);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLRA (SEC ID N°: 12);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 14);
 30 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIDWLLSA (SEC ID N°: 15);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLAA o (SEC ID N°: 16);
 HSQGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLLSA (SEC ID N°: 17).

9. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que R¹ es H.

35

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 parte correspondiente de la secuencia del PI-1 de la oxintomodulina humana que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala.

40

12. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que Z tiene una Cys como resto C terminal.

45

13. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en el Z está ausente.

14. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que una o más de las cadenas laterales de aminoácidos en el compuesto, por ejemplo en el péptido X, están conjugadas con un sustituyente lipófilo o con un resto polimérico.

50

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.

55

17. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 15 o un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 16.

60

18. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto, un ácido nucleico, un vector de expresión o una célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en mezcla con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65

19. El uso de un compuesto, ácido nucleico, vector de expresión o célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en la preparación de un medicamento para prevenir el aumento de peso, estimular la pérdida de peso, o para el tratamiento de una afección ocasionada por, o asociada con, sobrepeso corporal u obesidad, incluyendo obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedades de la vesícula biliar relacionadas con la obesidad y apnea del sueño inducida por obesidad, o para el tratamiento de

resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria o ictus.

5 20. Un compuesto, ácido nucleico, vector de expresión o célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso en un método de tratamiento médico.

10 21. Un compuesto, ácido nucleico, vector de expresión o célula hospedadora de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 para su uso en un método para prevenir el aumento de peso, estimular la pérdida de peso, o para el tratamiento de una afección ocasionada por, o asociada con, sobrepeso corporal u obesidad, incluyendo obesidad mórbida, inflamación relacionada con obesidad, enfermedad de la vesícula biliar relacionada con la obesidad y apnea del sueño inducida por obesidad, o para el tratamiento de resistencia a insulina, intolerancia a glucosa, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria o ictus.

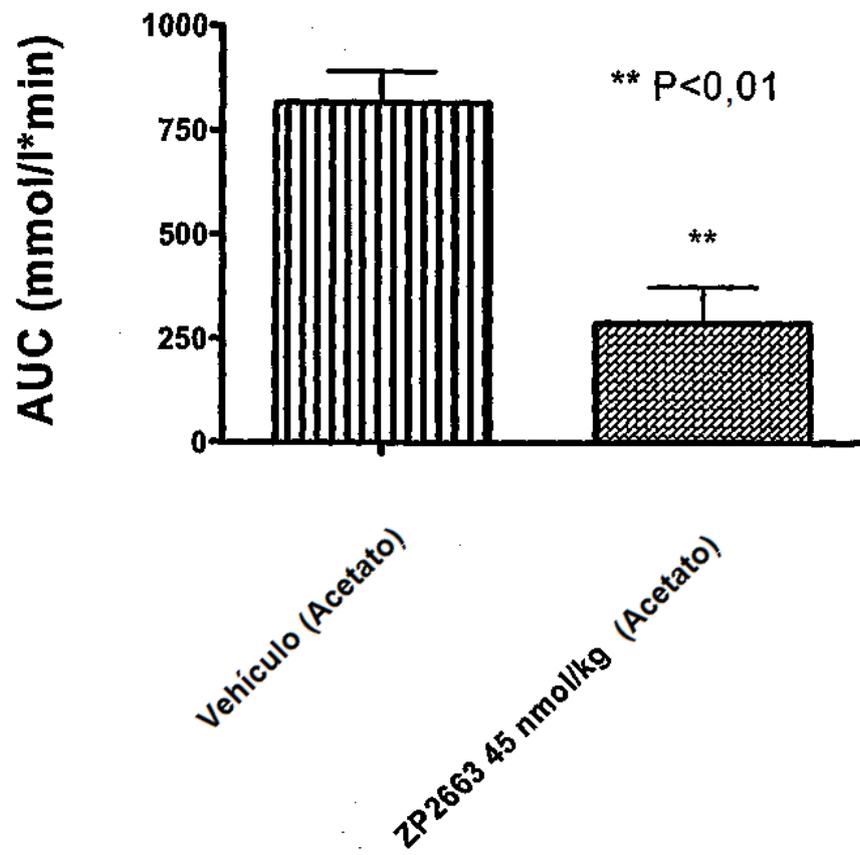
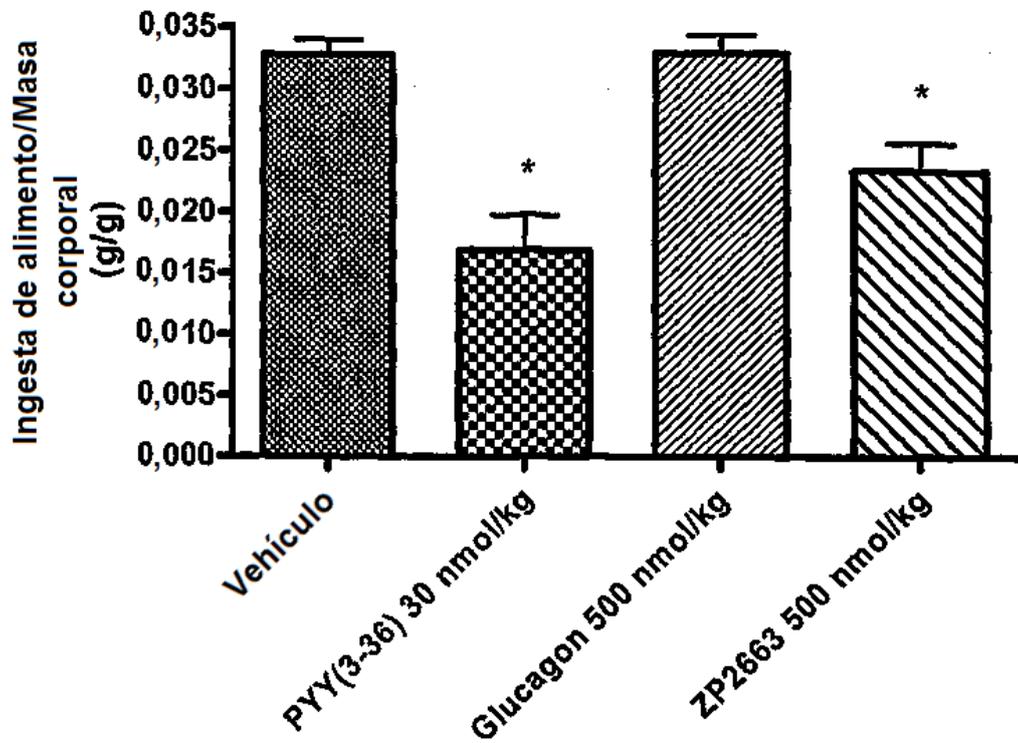


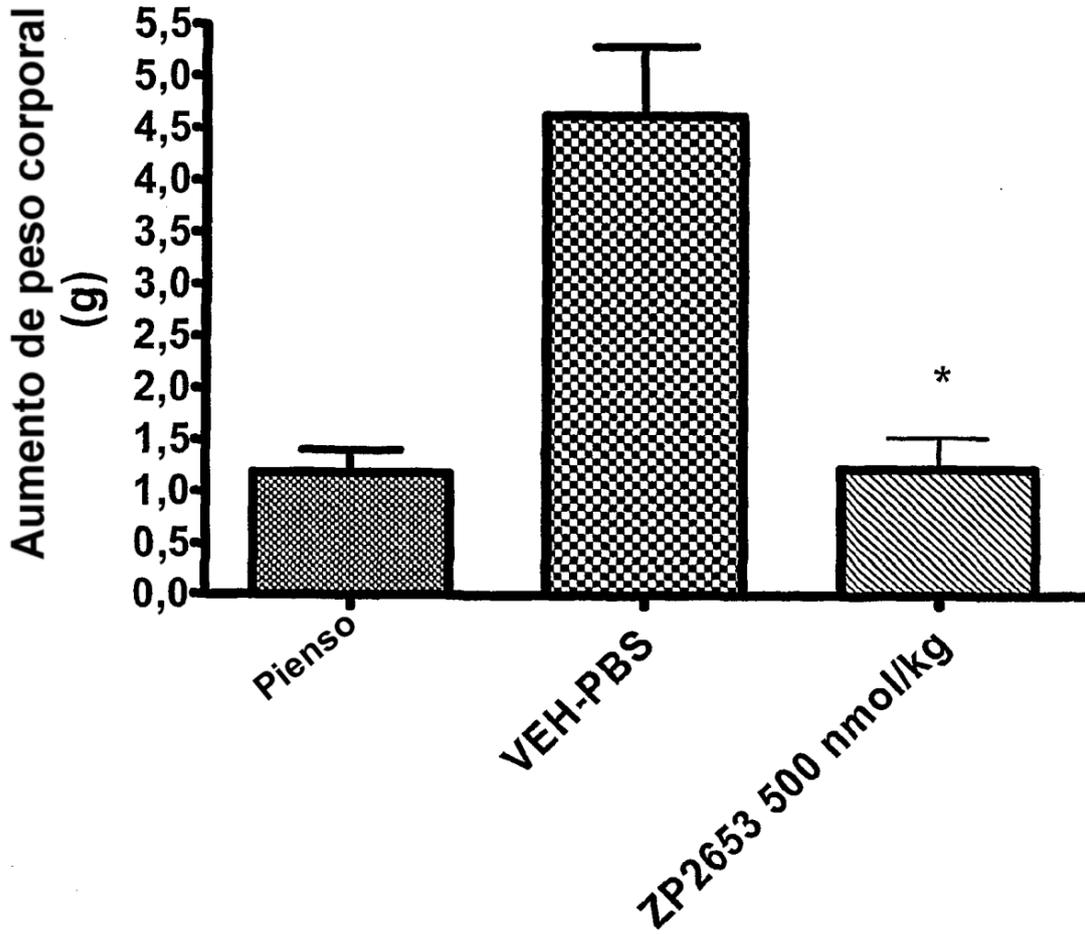
FIG. 1



* $p < 0,05$ comparado con vehículo

FIG. 2

Aumento de peso corporal (g)



* p < 0,05 comparado con vehículo

FIG. 3

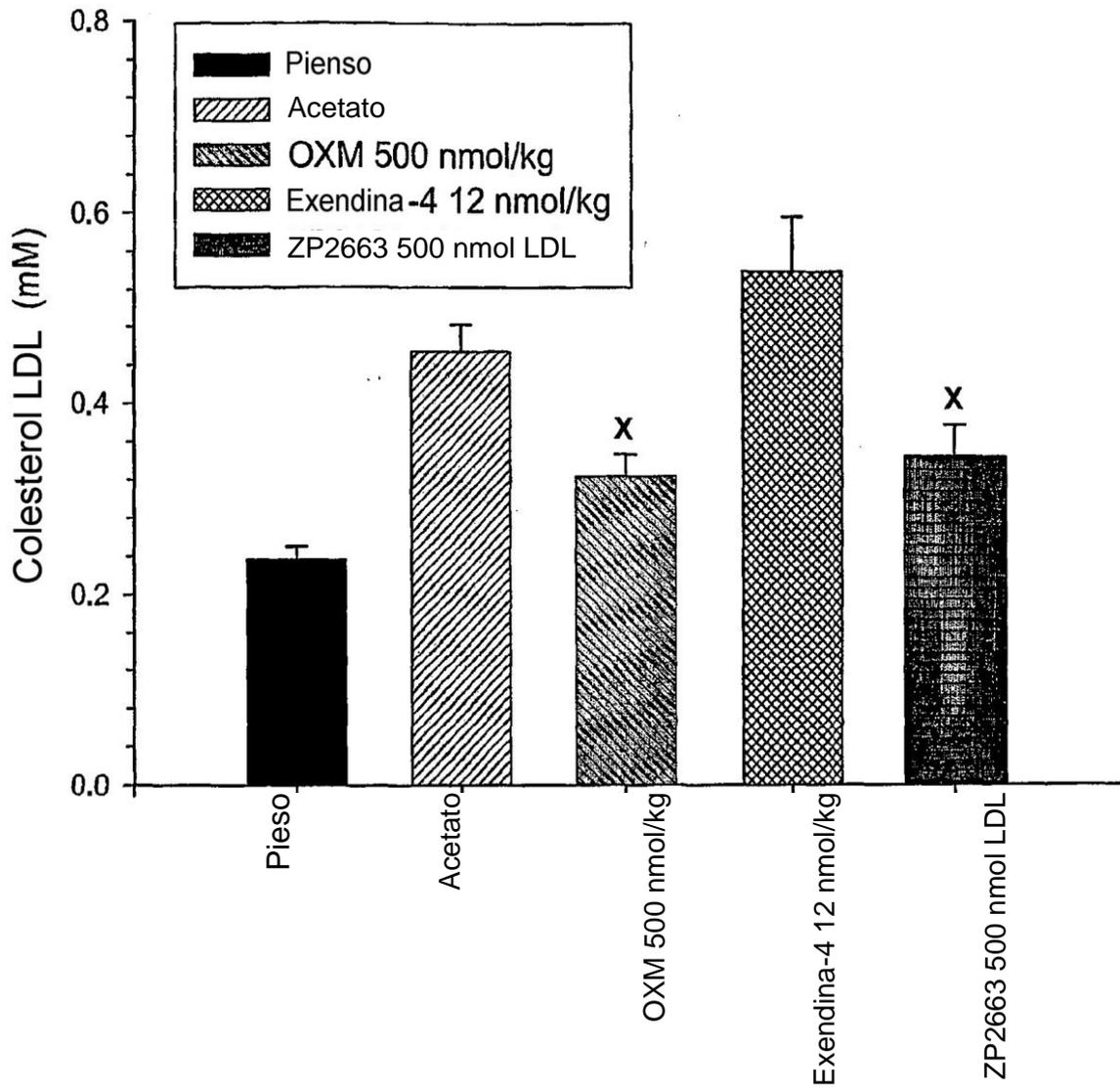


FIG. 4

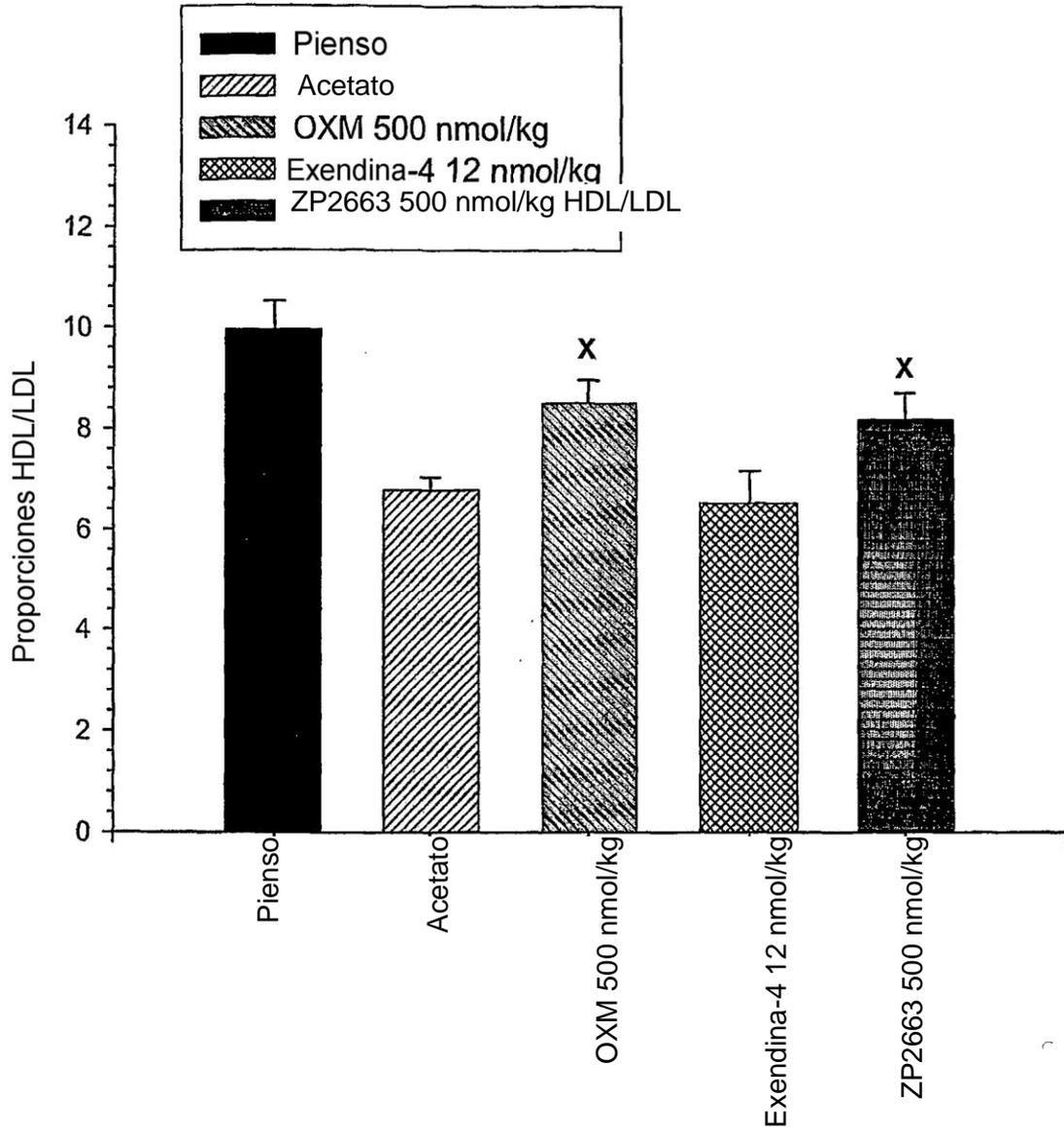


FIG. 5