

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 507 098**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.11.2006 E 06827600 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.07.2014 EP 1959986**

54 Título: **Análogos de glucagón que muestran solubilidad y estabilidad fisiológicas**

30 Prioridad:

**07.11.2005 US 734307 P**

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

**14.10.2014**

73 Titular/es:

**INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND  
TECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)  
351 WEST 10TH STREET  
INDIANAPOLIS, IN 46202, US**

72 Inventor/es:

**DIMARCHI, RICHARD D. y  
SMILEY, DAVID L.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 507 098 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 que muestran solubilidad y estabilidad fisiológicas

### 5 Antecedentes

Se produce hipoglucemia cuando los niveles de glucosa en sangre bajan demasiado para proporcionar suficiente energía para las actividades del cuerpo. En adultos o niños mayores de 10 años, la hipoglucemia es poco común excepto como un efecto secundario del tratamiento de la diabetes, pero puede resultar de otras medicaciones o enfermedades, deficiencias hormonales o enzimáticas o tumores. Cuando la glucosa en sangre comienza a caer, el glucagón, una hormona producida por el páncreas, señala al hígado para que degrade glucógeno y libere glucosa, provocando que los niveles de glucosa en sangre aumenten hacia un nivel normal. Sin embargo, para los diabéticos, esta respuesta del glucagón a la hipoglucemia puede estar alterada, haciendo más difícil que los niveles de glucosa vuelvan al intervalo normal.

La hipoglucemia es un acontecimiento con peligro para la vida que requiere atención médica inmediata. La administración de glucagón es una medicación establecida para el tratamiento de la hipoglucemia aguda y puede restaurar los niveles normales de glucosa en un periodo de minutos desde la administración. Cuando se usa glucagón en el tratamiento médico agudo de la hipoglucemia, se solubiliza una forma cristalina de glucagón con un tampón de ácido diluido y la solución se inyecta por vía intramuscular. Aunque este tratamiento es eficaz, la metodología es incómoda y peligrosa para alguien que está semiconsciente. En consecuencia, existe la necesidad de un análogo de glucagón que mantenga el rendimiento biológico de la molécula parental pero sea suficientemente soluble y estable, en condiciones fisiológicas relevantes. De modo que puede pre-formularse como una solución, lista para inyección.

Adicionalmente, se recomienda a los diabéticos que mantengan niveles de glucosa en sangre casi normales para retardar o prevenir las complicaciones microvasculares. La consecución de este objetivo habitualmente requiere terapia de insulina intensiva. Al intentar conseguir este objetivo, los médicos se han encontrado con un aumento sustancial de la frecuencia y gravedad de la hipoglucemia en sus pacientes diabéticos. En consecuencia, son necesarios productos farmacéuticos y metodologías mejorados para tratar la diabetes que tengan menos probabilidades de inducir hipoglucemia que las terapias de insulina actuales.

Como se describe en el presente documento, se proporcionan agonistas del glucagón de alta potencia que muestran estabilidad biofísica y solubilidad acuosa potenciadas. Estos compuestos pueden usarse de acuerdo con una realización para preparar soluciones pre-formuladas listas para inyección para tratar hipoglucemia. Como alternativa, los agonistas de glucagón pueden co-administrarse con insulina para tamponar los efectos de la insulina para permitir un mantenimiento más estable de los niveles de glucosa en sangre. Además, otros usos beneficiosos de composiciones que comprenden los péptidos de glucagón modificados desvelados en el presente documento se describen en detalle posteriormente.

### 40 Sumario

La invención proporciona un péptido como se define en la reivindicación 1.

De acuerdo con un aspecto los péptidos de glucagón desvelados en el presente documento se modifican por la adición de un segundo péptido al extremo carboxilo terminal del péptido de glucagón. En una realización un péptido de glucagón está unido covalentemente mediante un enlace peptídico con un segundo péptido, en el que el segundo péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20 y SEC ID N°: 21.

De acuerdo con una realización se proporciona una composición farmacéutica que comprende los péptidos de glucagón nuevos desvelados en el presente documento. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones que están esterilizadas y contenidas dentro de diversos envases. Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse adicionalmente como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para administrar la composición a un paciente.

Los péptidos o composiciones pueden usarse para tratar rápidamente la hipoglucemia usando una composición acuosa pre-formulada. El método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un péptido de glucagón modificado nuevo de la presente divulgación. En una realización, el péptido de glucagón está pegilado en la posición 21 o 24 del péptido de glucagón y la cadena de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Dalton. La solución de glucagón modificada puede pre-ensarsarse en un dispositivo que se usa para administrar la composición al paciente que padece hipoglucemia.

Los péptidos o composiciones pueden usarse en un método que se proporciona para regular los niveles de glucosa en sangre en pacientes dependientes de insulina. El método comprende las etapas de administrar insulina en una cantidad terapéuticamente eficaz para el control de la diabetes y administrar un péptido de glucagón modificado

nuevo de la presente divulgación en una cantidad terapéuticamente eficaz para la prevención de hipoglucemia, en el que dichas etapas de administración se realizan en un intervalo de doce horas entre sí. En una realización el péptido de glucagón y la insulina se co-administran como una única composición, en la que el péptido de glucagón está pegilado con una cadena de PEG que tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 40.000 Dalton.

Los péptidos o composiciones pueden usarse en un método para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal. El método comprende la etapa de administrar uno o más de los péptidos de glucagón pegilados desvelados en el presente documento a un paciente.

Los péptidos o composiciones pueden usarse en un método para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso, en el que el aminoácido 29 del péptido de glucagón está unido con un segundo péptido mediante un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20 o SEC ID N°: 21. En una realización el péptido de glucagón está pegilado.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de barras que representa la estabilidad de Glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> a 37 °C incubado durante 24, 48, 72, 96, 144 y 166 horas, respectivamente.

La Fig. 2 representa los datos generados del análisis de HPLC de Glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> a pH 5 incubado a 37 °C durante 24, 72 o 144 horas, respectivamente.

### Descripción detallada

#### Definiciones

Al describir y reivindicar la invención, se usará la siguiente terminología de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

Como se usa en el presente documento, la expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. La expresión también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del Gobierno Federal de los Estados Unidos o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

Como se usa en el presente documento la expresión “sal farmacéuticamente aceptable” se refiere a sales de compuestos que conservan la actividad biológica del compuesto parental, y que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Muchos de los compuestos desvelados en el presente documento son capaces de formar sales de ácidos y/o bases en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

Pueden prepararse sales de adición de bases farmacéuticamente aceptables a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas, incluyen solamente como ejemplo sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

Pueden prepararse sales de adición de ácidos farmacéuticamente aceptables a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumarico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanolsulfónico, ácido etanosulfónico, ácido *p*-tolueno-sulfónico, ácido salicílico y similares.

Como se usa en el presente documento, el término “tratar” incluye profilaxis del trastorno o afección específico, o alivio de los síntomas asociados con un trastorno específico o afección específica y/o prevención o eliminación de dichos síntomas.

Como se usa en el presente documento una cantidad “eficaz” o una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un péptido de glucagón se refieren a una cantidad no tóxica pero suficiente del péptido para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, un efecto deseado sería la prevención o tratamiento de la hipoglucemia. La cantidad que es “eficaz” variará entre sujetos, dependiendo de la edad y la condición general del individuo, el modo de administración y similares. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una “cantidad eficaz” exacta. Sin embargo, puede determinarse una cantidad “eficaz” apropiada en cualquier caso individual por un experto en la materia usando experimentación rutinaria.

El término “parenteral” significa no a través del canal alimentario sino por alguna otra vía tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal o intravenosa.

5 Un “péptido de glucagón” como se usa en el presente documento incluye cualquier péptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se define en la reivindicación 1.

La expresión “agonista de glucagón” se refiere a un complejo que comprende un péptido de glucagón.

10 Como se usa en el presente documento un “derivado agonista de glucagón” es un péptido de glucagón que se ha modificado para incluir una o más sustituciones de aminoácidos conservativas en una o más posiciones 5, 7, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28 o 29.

15 Como se usa en el presente documento, una “sustitución” de aminoácidos se refiere al reemplazo de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente.

Como se usa en el presente documento, la expresión “sustitución de aminoácidos conservativa” se define en el presente documento como intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

20 I. Restos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Restos polares, con carga negativa y sus amidas:

25 Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Restos polares, con carga positiva:

30 His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Restos grandes, alifáticos, no polares:

Met, Leu, Ile, Val, Cys, Norleucina (Nle), homocisteína

35 V. Restos grandes aromáticos:

Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

40 Como se usa en el presente documento, el término general “polietilenglicol” o “PEG”, se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena ramificada o sencilla, representada por la fórmula general  $H(OCH_2CH_2)_nOH$ , en la que n es al menos 9. Sin ninguna caracterización adicional, se pretende que el término incluya polímeros de etilenglicol con un peso molecular total medio seleccionado del intervalo de 500 a 40.000 Dalton. “Polietilenglicol” o “PEG” se usa en combinación con un sufijo numérico para indicar el peso molecular medio aproximado del mismo. Por ejemplo, PEG-5.000 se refiere a polietilenglicol que tiene un peso molecular total medio de aproximadamente 5.000.

50 Como se usa en el presente documento, el término “pegilado” y términos similares se refieren a un compuesto que se ha modificado desde su estado nativo uniendo un polímero de polietilenglicol con el compuesto. Un “péptido de glucagón pegilado” es un péptido de glucagón que tiene una cadena de PEG unida covalentemente con el péptido de glucagón.

55 Como se usa en el presente documento se pretende que una referencia general a un péptido abarque péptidos que tienen extremos amino y carboxilo terminal modificados. Por ejemplo, se pretende que una cadena de aminoácidos que comprende un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal esté abarcada por una secuencia de aminoácidos que designa los aminoácidos convencionales.

60 Como se usa en el presente documento un “enlazador” es un enlace, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los enlazadores pueden proporcionar separación óptima de las dos entidades o pueden proporcionar además un enlace lábil que permite que las dos entidades se separen entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, restos lábiles por ácido, restos lábiles por base y grupos escindibles por enzimas.

65 Como se usa en el presente documento un “dímero” es un complejo que comprende dos subunidades unidas covalentemente entre sí mediante un enlazador. El término dímero, cuando se usa sin ningún sentido calificador, abarca tanto homodímeros como heterodímeros. Un homodímero comprende dos subunidades idénticas, mientras que un heterodímero comprende dos subunidades que difieren, aunque las dos subunidades son sustancialmente

similares entre sí.

### Realizaciones

5 Una realización de la presente invención se dirige a una agonista de glucagón que se ha modificado en relación con el péptido de tipo silvestre de His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-  
10 Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEC ID N°: 1) para mejorar la solubilidad y estabilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico, conservando a la vez la actividad biológica del péptido nativo. De acuerdo con un aspecto, los solicitantes han descubierto que la introducción de grupos hidrófilos en la posición 24 del péptido nativo puede mejorar la solubilidad y estabilidad del análogo de glucagón resultante en soluciones que tienen un pH fisiológico.

De acuerdo con una realización el resto de lisina en la posición 12 del péptido nativo se sustituye con arginina y se inserta una única sustitución de lisina para el aminoácido presente en la posición 17.

15 La cadena de polietilenglicol puede estar en forma de una cadena sencilla o puede ser ramificada. De acuerdo con una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Dalton. En una realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton. En una realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado del intervalo de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 5.000 Dalton. En una realización la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado del intervalo de aproximadamente 4.000 a aproximadamente 5.000 Dalton.

25 En una realización, el agonista de glucagón comprende el péptido de SEC ID N°: 8. En una realización, el aminoácido terminal de los péptidos de glucagón de la presente invención tiene un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo.

30 Como se describe en detalle en los Ejemplos, los agonistas de glucagón de la presente invención tienen estabilidad biofísica y solubilidad acuosa potenciadas conservando a la vez la bioactividad del péptido nativo, tanto en términos de potencia como en selectividad en los receptores de glucagón. En consecuencia, se cree que los agonistas de glucagón de la presente invención son adecuados para cualquier uso que se ha descrito previamente para el péptido de glucagón nativo. En consecuencia, los péptidos de glucagón modificados descritos en el presente documento pueden usarse para tratar la hipoglucemia, para inducir parálisis temporal del intestino para usos radiológicos, para reducir y mantener el peso corporal, o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de bajos niveles en sangre de glucagón.

35 Un aspecto de la presente divulgación se refiere a una solución acuosa pre-formulada del agonista de glucagón desvelado en el presente documento para su uso en el tratamiento de la hipoglucemia. La estabilidad y solubilidad mejoradas de las composiciones de agonista descritas en el presente documento permiten la preparación de soluciones acuosas pre-formuladas de glucagón para rápida administración y tratamiento de hipoglucemia. En una realización, se proporciona una solución que comprende un agonista de glucagón pegilado para su administración a un paciente que padece hipoglucemia, en el que el peso molecular total de las cadenas de PEG unidas con el agonista de glucagón pegilado está entre aproximadamente 500 y aproximadamente 5.000 Dalton. En un aspecto de la divulgación el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 y los derivados de agonista de glucagón de SEC ID N°: 3 en el que la cadena lateral de un resto de aminoácido en la posición 24 de dicho péptido de glucagón está unida covalentemente con la cadena de polietilenglicol.

40 El método para tratar hipoglucemia comprende las etapas de administrar los agonistas de glucagón desvelados en el presente documento con pacientes usando cualquier vía convencional de administración, incluyendo por vía parental, tal como por vía intravenosa, por vía subcutánea o por vía intramuscular, por vía transdérmica, por vía rectal, por vía oral, por vía nasal o por inhalación. En un aspecto la composición se administra por vía subcutánea o por vía intramuscular. En un aspecto, la composición se administra por vía parenteral y la composición de glucagón se preenvasa en una jeringa. En un aspecto la composición de glucagón para administrar para tratar a un individuo que padece hipoglucemia se proporciona como dos soluciones separadas. La primera solución comprende el agonista de glucagón en una solución acuosa a un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5. En una realización la primera solución tiene un pH de aproximadamente 5,0. La segunda solución acuosa está a un pH mayor de 7,0 de modo que cuando la primera solución se mezcla con la segunda solución el pH de la mezcla resultante es aproximadamente a pH fisiológico. En un aspecto, después de la mezcla de la primera y segunda soluciones, el pH de la mezcla resultante es de aproximadamente 7,4. En un aspecto la primera y segunda soluciones están contenidas dentro de un único recipiente y separadas entre sí por una válvula o sello en el que tras la apertura de la válvula, o rotura del sello, las dos soluciones se mezclan para proporcionar una composición que comprende un péptido de glucagón y vehículo farmacéuticamente aceptable en el que el pH de la composición está a un pH fisiológicamente aceptable. De esta manera, el recipiente que comprende las dos soluciones puede almacenarse durante períodos largos de tiempo. En un momento de necesidad las dos soluciones pueden mezclarse y administrarse rápidamente al paciente.

Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que pueden prepararse péptidos de glucagón pegilados que conservan la bioactividad y especificidad del péptido parental. Sin embargo, el aumento de la longitud de la cadena de PEG, o la unión de múltiples cadenas de PEG al péptido, de modo que el peso molecular total del PEG unido sea mayor de 5000 Dalton, comienza a retardar la acción temporal del glucagón modificado. De acuerdo con una realización, se proporciona un péptido de glucagón en el que el péptido comprende una o más cadenas de polietilenglicol, en el que el peso molecular total del PEG unido es mayor de 5.000 Dalton, y en una realización es mayor de 10.000 Dalton. Dichos péptidos de glucagón modificado tienen un tiempo de actividad retardado pero sin pérdida de la bioactividad. En consecuencia, dichos compuestos pueden administrarse de forma profiláctica para extender el efecto del péptido de glucagón administrado.

En un aspecto de la divulgación el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 y derivados de agonista de glucagón de SEC ID N°: 3, en el que la cadena lateral de un resto de aminoácido en la posición 24 de dicho péptido de glucagón está unido covalentemente con una o más cadenas de polietilenglicol que tienen un peso molecular combinado de más de aproximadamente 10.000 Dalton, y en una realización el peso molecular de la cadena o las cadenas de PEG es mayor de 10.000 y menor de o igual a 40.000 Dalton.

Los péptidos de glucagón que se han modificado para unirse covalentemente con una cadena de PEG que tiene un peso molecular de más de 10.000 Dalton pueden administrarse junto con insulina para tamponar las acciones de la insulina y ayudar a mantener los niveles de glucosa en sangre estables en diabéticos. Los péptidos de glucagón modificados de la presente divulgación pueden coadministrarse con insulina como una única composición, administrarse simultáneamente como soluciones separadas o, como alternativa, la insulina y el péptido de glucagón modificado pueden administrarse en momentos diferentes entre sí. En una realización, la composición que comprende insulina y la composición que comprende el péptido de glucagón modificado se administran en un intervalo 12 horas entre sí. La relación exacta del péptido de glucagón modificado en relación con la insulina administrada dependerá en parte de la determinación de los niveles de glucagón del paciente, y pueden determinarse mediante experimentación rutinaria.

De acuerdo con un aspecto de la divulgación se proporciona una solución acuosa que comprende insulina y un péptido de glucagón modificado de la invención que comprende una cadena de polietilenglicol unida covalentemente con una cadena lateral de aminoácido en la posición 24.

La presente divulgación también abarca péptidos de fusión de glucagón en los que se ha fusionado un segundo péptido con el extremo c terminal del péptido de glucagón. Más particularmente, el péptido de glucagón de fusión puede comprender un agonista de glucagón derivado de SEC ID N°: 1 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS), SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA) o SEC ID N°: 21 (KRNR) unida con el aminoácido 29 del péptido de glucagón. En una realización la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS), SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA) o SEC ID N°: 21 (KRNR) está unida con el aminoácido 29 del péptido de glucagón mediante un enlace peptídico. En un aspecto de la invención la parte peptídica de glucagón del péptido de fusión de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 3, SEC ID N°: 8 y en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Dalton. Más particularmente, en un aspecto de la invención el segmento de péptido de glucagón se selecciona de SEC ID N°: 8 en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 500 a 5.000.

En un aspecto de la divulgación se proporciona un péptido de fusión de glucagón que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, unido covalentemente con la secuencia de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS) o SEC ID N°: 21, en el que la cadena de PEG, cuando está presente, se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Dalton. En un aspecto de la divulgación el péptido de fusión comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, unido covalentemente con la secuencia de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS) o SEC ID N°: 21. En otro aspecto de la divulgación el péptido de fusión comprende un péptido de glucagón seleccionado de SEC ID N°: 8, secuencia de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS) o SEC ID N°: 21.

En un aspecto de la divulgación la composición comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 8 unidos covalentemente con la secuencia de SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA). En una realización el péptido de fusión comprende un péptido de glucagón seleccionado de SEC ID N°: 8, unido covalentemente con la secuencia de SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA). En otra realización, el péptido de fusión comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 8, unido covalentemente con la secuencia de SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA).

De acuerdo con una realización los péptidos de glucagón modificados desvelados en el presente documento se usan para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal. Este método tiene utilidad para fines radiológicos y comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón pegilado. En una realización la cadena de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Dalton.

En una realización adicional la composición usada para inducir parálisis temporal del tracto intestinal comprende un primer péptido de glucagón modificado y un segundo péptido de glucagón modificado, en el que el primer péptido modificado comprende una cadena de PEG unida covalentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Dalton y el segundo péptido comprende una cadena de PEG unida covalentemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Dalton. En esta realización la cadena de PEG de cada péptido está unida covalentemente con un resto de aminoácido en la posición 24 de los péptidos respectivos, e independientemente entre sí.

Se ha indicado que la oxintomodulina, una hormona digestiva de origen natural hallada en el intestino delgado, provoca pérdida de peso cuando se administra a ratas o seres humanos (véase Diabetes 2005; 54: 2390-2395). La oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que contiene la secuencia de 29 aminoácidos de glucagón (es decir SEC ID N° 1) seguida de una extensión carboxilo terminal de 8 aminoácidos SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA). En consecuencia, los solicitantes creen que la bioactividad de la oxintomodulina puede conservarse (es decir supresión del apetito y pérdida de peso/mantenimiento de peso inducido), mejorando a la vez la solubilidad y estabilidad del compuesto y mejorando la farmacocinética, sustituyendo la parte de péptido de glucagón de oxintomodulina con los péptidos de glucagón modificados desvelados en el presente documento. Además los solicitantes también creen que una molécula de oxintomodulina troncada que tenga los cuatro aminoácidos terminales retirados también será eficaz en la supresión del apetito e inducción de pérdida de peso/mantenimiento de peso.

En consecuencia, la presente invención también abarca los péptidos de glucagón modificados de la presente invención que tienen una extensión carboxilo terminal de SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA) o SEC ID N°: 21. De acuerdo con una realización se administra un derivado de agonista de glucagón de SEC ID N°: 1 que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA) o SEC ID N°: 21 unida con el aminoácido 29 del péptido de glucagón a individuos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso. En otro aspecto de la divulgación un método para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso en un individuo comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 3 en el que el aminoácido 29 del péptido de glucagón está unido con un segundo péptido a través de un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEC ID N°: 20 (KRNRNNIA) o SEC ID N°: 21.

La exendina-4 es un péptido compuesto de 39 aminoácidos. Es un estimulador potente de un receptor conocido como GLP-1. También se ha indicado que este péptido suprime el apetito e induce a la pérdida de peso. Los solicitantes han descubierto que la secuencia terminal de Exendina-4 cuando se añade en el extremo carboxilo terminal de glucagón mejora la solubilidad y estabilidad del glucagón sin comprometer la bioactividad del glucagón. En una realización los diez aminoácidos terminales de Exendina-4 (es decir la secuencia de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS)) están unidos con el extremo carboxilo terminal de un péptido de glucagón de la presente divulgación. Se anticipa que estas proteínas de fusión tienen actividad farmacológica para suprimir el apetito e inducir el mantenimiento de peso/pérdida de peso. En una realización el aminoácido terminal de la extensión de SEC ID N°: 19 comprende un grupo amida en lugar del grupo carboxilo.

En un aspecto de la divulgación un método para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso en un individuo comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 8, en el que el aminoácido 29 del péptido de glucagón está unido con un segundo péptido mediante un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS). En un aspecto el péptido de glucagón del agonista de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEC ID N°: 1, SEC ID N°: 3 y SEC ID N°: 8, en el que el peso molecular de la cadena de PEG cuando está presente se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Dalton.

En otro ejemplo se administra una composición a un paciente para suprimir el apetito, prevenir el aumento de peso y/o inducir la pérdida de peso por la administración de una composición farmacéutica que comprende un primer péptido de glucagón pegilado y un segundo péptido de glucagón pegilado, en la que el primer y segundo péptidos son péptidos de fusión que comprenden una extensión de péptido c-terminal que comprende SEC ID N°: 19 (GPSSGAPPPS). El primer péptido de glucagón pegilado comprende un PEG unido covalentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Dalton y el segundo péptido de glucagón pegilado comprende una cadena de PEG unida covalentemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Dalton.

La presente divulgación también abarca multímeros de los péptidos de glucagón modificados desvelados en el presente documento. Dos o más de los péptidos de glucagón modificados pueden unirse entre sí usando agentes de enlace convencionales y procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden formarse dímeros entre dos péptidos de glucagón modificados mediante el uso de reticuladores de tiol bifuncionales y reticuladores de amina bifuncionales, particularmente para los péptidos de glucagón que se han sustituido con restos de cisteína, lisina, ornitina, homocisteína o acetil fenilalanina (por ejemplo SEC ID N°: 3). El dímero puede ser un homodímero o como alternativa puede ser un heterodímero. En un aspecto de la divulgación el dímero comprende un homodímero de un péptido de fusión de glucagón en el que la parte de péptido de glucagón comprende un derivado agonista de SEC ID N°: 1 y comprendiendo el segundo péptido una secuencia de aminoácidos de SEC ID

Nº: 19 (GPSSGAPPPS), SEC ID Nº: 20 (KRNRNIA) o SEC ID Nº: 21 (KRNR) unida con el aminoácido 29 del péptido de glucagón. En otro aspecto de la divulgación el dímero comprende un homodímero de un derivado de agonista de glucagón de SEC ID Nº: 1, en el que el péptido de glucagón comprende además una cadena de polietilenglicol unida covalentemente con la posición 24 del péptido de glucagón.

Los péptidos de glucagón modificados de la presente invención pueden proporcionarse de acuerdo con un aspecto como parte de un kit. En un aspecto el kit se proporciona con un dispositivo para administrar el glucagón a un paciente. El kit puede incluir diversos recipientes, por ejemplo, frascos, tubos, botellas y similares. Preferentemente, los kits también incluirán instrucciones para su uso. De acuerdo con una realización el dispositivo del kit es un dispositivo de dispersión de aerosol, en el que la composición está pre-ensada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización la composición de glucagón está pre-ensada dentro de la jeringa. Los compuestos de la presente invención pueden prepararse por métodos sintéticos convencionales, técnicas de ADN recombinante o cualquier otro método para preparar péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no pueden expresarse por técnicas de ADN recombinante convencionales, se conocen en este campo técnicas para su preparación. Pueden sintetizarse compuestos de la presente invención que abarcan partes no peptídicas mediante reacciones de química orgánica convencionales, además de reacciones de química peptídica convencionales cuando sea aplicable.

### Ejemplos

Protocolo de Síntesis General:

Se sintetizaron análogos de glucagón usando acoplamiento sencillo "Fast Boc" activado por HBTU comenzando desde 0,2 mmoles de resina de Boc Thr(OBzl)Pam en un sintetizador peptídico Applied Biosystem 430 A modificado. Se obtuvieron aminoácidos Boc y HBTU de Midwest Biotech (Fishers, IN). Los grupos protectores de cadena lateral usados fueron:

Arg(Tos), Asn(Xan), Asp(OcHex), Cys(pMeBzl), His(Bom), Lys(2Cl-Z), Ser(OBzl), Thr(OBzl), Tyr(2Br-Z) y Trp(CHO). El grupo protector de cadena lateral en el His N-terminal fue Boc.

Cada resina de peptidilo completada se trató con una solución de piperidina al 20 % en dimetilformamida para retirar el grupo formilo del triptófano. Se realizaron escisiones de fluoruro de hidrógeno líquido en presencia de *p*-cresol y dimetilsulfuro. La escisión se procesó durante 1 hora en un baño de hielo usando un aparato HF (Penninsula Labs). Después de la evaporación del HF, el resto se suspendió en dietil éter y los materiales sólidos se filtraron. Cada péptido se extrajo en 30-70 ml de ácido acético acuoso y se analizó una alícuota diluida por HPLC [Beckman System Gold, Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm, tampón A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1%/acetonitrilo 90 %, gradiente de 10 % a 80 % B durante 10 min].

Se realizó purificación en una FPLC sobre una columna Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm controlando a la vez la UV a 214 nm y recogiendo fracciones de 5 minutos. Las fracciones homogéneas se combinaron y se liofilizaron para proporcionar una pureza de producto de >95 %. La masa molecular y pureza correctas se confirmaron usando el análisis espectral de masas MALDI.

Protocolo de Pegilación General: (Cys-maleimido)

Normalmente, el análogo de Cys de glucagón se disuelve en solución salina tamponada con fosfato (5-10 mg/ml) y se añade ácido etilendiaminotetraacético 0,01 M (10-15 % del volumen total). Se añade reactivo de maleimido metoxi PEG en exceso (2 veces) (Nektar) y la reacción se agita a temperatura ambiente controlando a la vez el progreso de la reacción por HPLC. Después de 8-24 horas, la mezcla de reacción se acidifica y se carga en una columna de fase inversa preparatoria para purificación usando gradiente de TFA 0,1 %/acetonitrilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para proporcionar los derivados pegilados deseados.

### EJEMPLO 1

Síntesis de Glucagón Cys<sup>17</sup> (1-29) y análogos similares de MonoCys

Se introdujeron 0,2 mmoles de resina Boc Thr(OBzl) Pam (SynChem Inc) en un recipiente de reacción a 60 ml y la siguiente secuencia y se procesó en un Sintetizador Peptídico Applied Biosystem 43 0A modificado usando acoplamientos individuales activados por HBTU FastBoc.

HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEC ID Nº: 28). Se usaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO) y Tyr(Br-Z). La resina de peptidilo completada se trató con piperidina/dimetilformamida al 20 % para retirar la protección de Trp formilo, después se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó en vacío. Se añadieron 1,0 ml de *p*-cresol y 0,5 ml de dimetil sulfuro junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó y se condensaron en él

10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 h, después se retiró el HF en vacío. El resto se suspendió en etil éter; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter, y el péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se realizó una HPLC analítica [Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm, tampón A de TFA 0,1 %, tampón B de TFA 0,1 %/ACN 90 %, gradiente = 10 % B a 80 % B durante 10 min] con una pequeña muestra del extracto de escisión. El extracto restante se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm y se procesó un gradiente de acetonitrilo usando un sistema de FPLC Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min controlando a la vez la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/acetonitrilo 50 %. Gradiente = 30 % B a 100 % B durante 450 min.

10 Las fracciones que contenían el producto más puro (48-52) se combinaron congeladas, y se liofilizaron para proporcionar 30,1 mg. Un análisis de HPLC del producto demostró una pureza de >90 % y el análisis espectral de masas MALDI demostró la masa deseada de 3429,7. Se prepararon de forma similar Glucagón Cys<sup>21</sup>, Glucagón Cys<sup>24</sup> y Glucagón Cys<sup>29</sup>.

## 15 EJEMPLO 2

Síntesis de Glucagón-Cex y otros análogos extendidos en C-terminal.

20 Se colocaron 285 mg (0,2 mmoles) de resina de metoxibenzidrilamina (Midwest Biotech) en un recipiente de reacción de 60 ml y se introdujo la siguiente secuencia y se procesó en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 43 0A modificado usando acoplamientos individuales activados por HBTU FastBoc.

HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEC ID N°: 29)

25 Se usaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO) y Tyr(Br-Z). La resina de peptidilo completada se trató con piperidina/dimetilformamida al 20 % para retirar la protección de Trp formilo, después se transfirió al recipiente de reacción de HF y se secó en vacío. Se añadieron 1,0 ml de *p*-cresol y 0,5 ml de dimetil sulfuro junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato HF (Pennisula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó y se condensaron en él aproximadamente 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 h, después el HF se retiró en vacío. El resto se suspendió en etil éter; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter, y el péptido se extrajo a 50 ml de ácido acético acuoso. Se realizó una HPLC analítica [Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm, tampón A de TFA 0,1 %, tampón B de TFA 0,1 %/ACN 90 %, gradiente = 10 % B a 80 % B durante 10 min] en una alícuota del extracto de escisión. El extracto se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm y se procesó un gradiente de acetonitrilo para elución usando un sistema de FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min controlando a la vez la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/acetonitrilo 50 %. Gradiente = 30 % B a 100 % B durante 450 min. Las fracciones 58-65 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 198,1 mg.

40 El análisis de HPLC mostró una pureza de más del 95 %. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de la masa teórica deseada de 4316,7 con el producto como una amida C-terminal. La oxintomodulina y oxintomodulina-KRNR se prepararon de forma similar como los ácidos carboxílicos C-terminales comenzando con la resina PAM cargada de forma apropiada.

## 45 EJEMPLO 3

Glucagón Cys<sup>17</sup> Mal-PEG-5K

50 Se disolvieron 15,1 mg de Glucagón Cys<sup>17</sup>(1-29) y 27,3 mg de metoxi poli(etilenglicol)maleimida de P.M. medio 5000 (mPEG-Mal-5000, Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 mg de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se controló mediante análisis de HPLC [Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm (0,5A), A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 90 %, gradiente = 10 % B a 80 % B durante 10 min].

55 Después de 5 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm. Se procesó un gradiente de acetonitrilo en una FPLC Pharmacia controlando a la vez la longitud de onda de UV a 214 nm y recogiendo fracciones de 5 min. A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/acetonitrilo 50 %, gradientes de 30 % B a 100 % B durante 450 min. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 25,9 mg.

60 Este producto se analizó en HPLC [Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm (0,5 A), A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 90 %, gradiente = 10 % B a 80 % B durante 10 min] que mostraron una pureza de aproximadamente 90 %. El análisis espectral de masas MALDI (desorción e ionización por láser asistida por matriz) mostró un intervalo de masas amplio (típico de derivados de PEG) de 8700 a 9500. Esto muestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3429) de aproximadamente 5.000 u.m.a.

65

## EJEMPLO 4

Glucagón Cys<sup>21</sup> Mal-PEG-5K

5 Se disolvieron 21,6 mg de Glucagón Cys<sup>21</sup> y 24 mg de mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 2 h, se añadieron otros 12,7 mg de mPEG-MAL-5000. Después de 8 h, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Vydac C18 de 2,2 x 25 cm y se procesó un gradiente de acetonitrilo en una FPLC de Pharmacia a 4 ml/min recogiendo a la vez fracciones de 5 min. A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 50 %. Gradiente = 20 % a 80 % B durante 450 min.

15 Las fracciones correspondientes a la aparición del producto se combinaron congeladas y se liofilizaron para proporcionar 34 mg. El análisis del producto por HPLC analítica [Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm (0,5 A), A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 90 %, gradiente = 10 % B a 80 % B durante 10 min] mostró un producto homogéneo que era diferente del péptido de glucagón de partida. El análisis espectral de masas de MALDI (desorción e ionización por láser asistida por matriz) mostró un intervalo de masas amplio (típico de derivados de PEG) de 8700 a 9700. Esto muestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3470) de aproximadamente 5.000 u.m.a.

## EJEMPLO 5

Glucagón Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-5K

25 Se disolvieron 20,1 mg de Glucagón C<sup>24</sup> (1-29) y 39,5 mg de mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 h. Después se añadieron otros 40 mg de mPEG-MAL-5000. Después de aproximadamente 15 h, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Vydac C18 de 2,2 x 25 cm y se procesó un gradiente de acetonitrilo usando una FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min controlando la vez la UV a 214 nm (2,0 A). Tampón A = TFA 0,1 %, tampón B = TFA 0,1 %/ACN 50 %, gradiente = 30 % B a 100 % B durante 450 min. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 45,8 mg. El análisis espectral de masas MALDI mostró una señal amplia de PEG típica con un máximo a 9175,2 que es aproximadamente 5.000 u.m.a. más que el Glucagón CT (3457,8).

## EJEMPLO 6

Glucagón Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-20K

35 Se disolvieron 25,7 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> (1-29) y 40,7 mg de mPEG-MAL-20K (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS agitando a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. Después de 6 h, la relación del material de partida y producto era de aproximadamente 60:40 como se determinó por HPLC. Se añadieron otros 25,1 mg de mPEG-MAL-20K y se permitió que la reacción se agitara durante otras 16 h. La relación de producto no había mejorado significativamente, de modo que la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm y se purificó en una FPLC de Pharmacia usando un gradiente de 30 % B a 100 % B durante 450 min. Tampón A = TFA 0,1 %, tampón B = TFA 0,1 %/ACN 50 %, caudal = 4 ml/min y se recogieron fracciones de 5 min controlando la UV a 214 nm (2,0 A). Las fracciones que contenían producto homogéneo se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 25,7 mg. La pureza como se determinó por HPLC analítica fue de -90 %. Un análisis espectral de masas MALDI mostró un pico amplio de 23.000 a 27.000 que es aproximadamente 20.000 u.m.a. más que el Glucagón C<sup>24</sup> de partida (3457,8).

## EJEMPLO 7

Glucagón Cys<sup>29</sup> Mal-PEG-5K

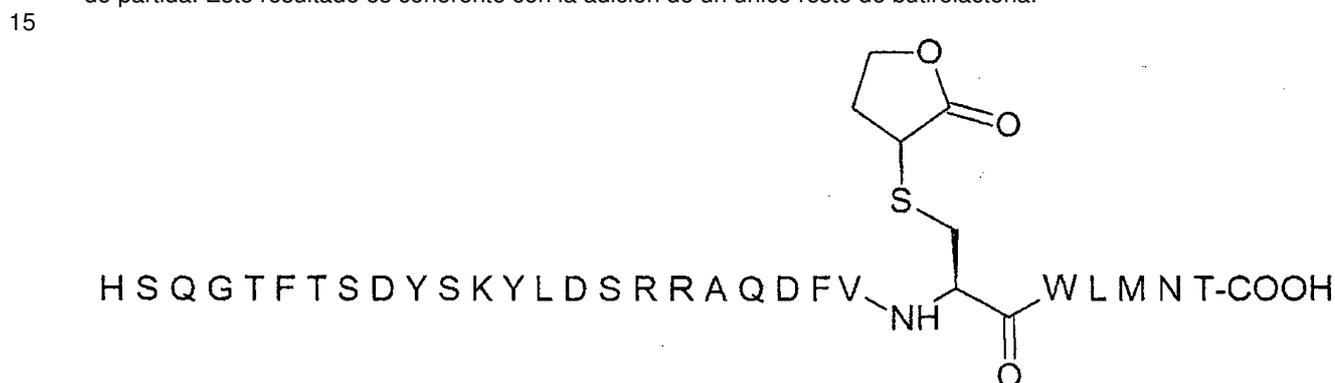
55 Se disolvieron 20,0 mg de Glucagón Cys<sup>29</sup> (1-29) y 24,7 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. Después de 4 h, se añadieron otros 15,6 mg de mPEG-Mal-5000 para conducir la reacción hasta su compleción. Después de 8 h, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Vydac C18 de 2,2 x 25 cm y se procesó un gradiente de acetonitrilo en un sistema de FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min controlando a la vez la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 50 %. Las fracciones 75-97 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 40,0 mg de producto que es diferente del material de partida recuperado en HPLC (fracciones 58-63). El análisis de producto por HPLC analítica [Zorbax C8 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45 C, 214 nm, (0,5 A), A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 90 %, gradiente = 10 % B a 80 % B durante 10 min] mostró una pureza mayor del 95 %. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de un componente de PEG con un intervalo de masas de 8.000 a 10.000 (máximo a 9025,3) que es 5.540 u.m.a. mayor que el material de partida (3484,8).

65

## EJEMPLO 8

Glucagón Cys<sup>2</sup> (2-butirolactona)

5 A 24,7 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> (1-29) se añadieron 4 ml de bicarbonato de amonio 0,05 M/acetronitrilo 50 % y 5,5  $\mu$ l de una solución de ácido 2-bromo-4-hidroxi-butírico-7-lactona (100  $\mu$ l en 900  $\mu$ l de acetronitrilo). Después de 3 h de agitación a temperatura ambiente, se añadieron otros 105  $\mu$ l de solución de lactona a la mezcla de reacción que se agitó durante otras 15 h. La mezcla de reacción se diluyó a 10 ml con ácido acético acuoso 10 % y se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Kromasil Cl 8 de 2,2 x 25 cm. Se procesó un gradiente de acetronitrilo (20 % B a 80 % B durante 450 min) en una FPLC de Pharmacia recogiendo a la vez fracciones de 5 min y controlando la UV a 214 nm (2,0 A). Caudal = 4 ml/min, A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 50 %. Las fracciones 74-77 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 7,5 mg. El análisis de HPLC mostró una pureza del 95 % y el análisis espectral de masas MALDI mostró una masa de 3540,47 u 84 unidades de masa más que el material de partida. Este resultado es coherente con la adición de un único resto de butirolactona.



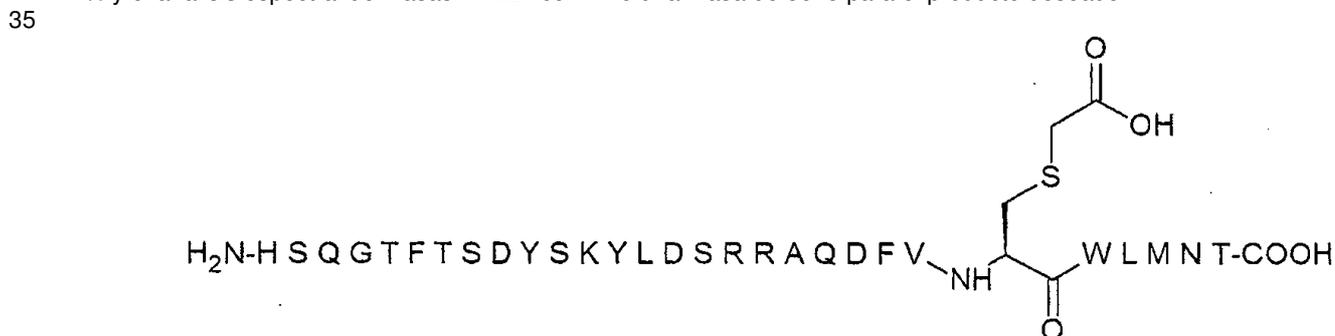
20

Peso molecular = 3541,91  
 Masa Exacta = 3538  
 Fórmula Molecular = C<sub>155</sub>H<sub>226</sub>N<sub>42</sub>O<sub>50</sub>S<sub>2</sub>

## EJEMPLO 9

## Glucagón Cys (S-carboximetilo)

25 Se disolvieron 18,1 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> (1-29) en 9,4 ml de tampón de fosfato sódico 0,1 M (pH = 9,2) y se añadieron 0,6 ml de solución de ácido bromoacético (1,3 mg/ml en acetronitrilo). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se siguió por HPLC analítica. Después de 1 h se añadieron otros 0,1 ml de solución de ácido bromoacético. La reacción se agitó otros 60 min. Después se acidificó con ácido acético acuoso y se cargó en una columna de fase inversa preparatoria Kromasil Cl8 de 2,2 x 25 cm para purificación. Se procesó un gradiente de acetronitrilo en una FPLC de Pharmacia (caudal = 4 ml/min) recogiendo a la vez fracciones de 5 min y controlando la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 50 %. Las fracciones 26-29 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar varios mg del producto. La HPLC analítica mostró una pureza del 90 % y el análisis espectral de masas MALDI confirmó una masa de 3515 para el producto deseado.



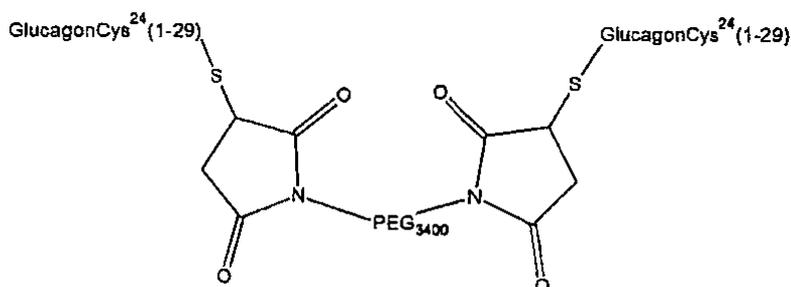
40

Peso molecular = 3515,87  
 Masa Exacta = 3512  
 Fórmula Molecular = C<sub>153</sub>H<sub>224</sub>N<sub>42</sub>O<sub>50</sub>S<sub>2</sub>

EJEMPLO 10

Dímero de glucagón Cys<sup>24</sup> maleimido, PEG-3,4K

5 Se disolvieron 16 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> y 1,02 mg de Mal-PEG-Mal-3400, poli(etilenglicol)-bismaleimida de P.M. medio 3400, (Nektar Therapeutics) en solución salina tamponada con fosfato 3,5 y 0,5 ml de EDTA 0,01 M y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 16 h, se añadieron otros 16 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> y se continuó la agitación. Después de aproximadamente 40 h, la mezcla de reacción se cargó en una columna PepRPC 16/10 de Pharmacia y se procesó un gradiente de acetonitrilo en una FPLC de Pharmacia recogiendo a la vez 10 fracciones de 2 min y controlando la UV a 214 nm (2,0 A). Caudal = 2 ml/min, A = TFA 0,1 %, B = TFA 0,1 %/ACN 50 %. Las fracciones 69-79 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para proporcionar 10,4 mg. La FJDPLC analítica mostró una pureza del 90 % y el análisis espectral de masas MALDI mostró un componente en el intervalo de 9500-11.000 que es coherente con el dímero deseado.



15

3457,80  
3457,80  
3572,00  
10487,60

EJEMPLO 11

20 Ensayos de solubilidad de Glucagón:

Se prepara una solución (1 mg/ml o 3 mg/ml) de glucagón (o un análogo) en HCl 0,01 N. Se diluyen 100 µl de solución de reserva a 1 ml con HCl 0,01 N y se determina la absorbancia de UV (275 nm). El pH de la solución de reserva restante se ajusta a pH 7 usando 200-250 µl de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 9,2). Se permite que la solución repose 25 durante una noche a 4 °C y después se centrifuga. Se diluyen después 100 µl de sobrenadante a 1 ml con HCl 0,01 N, y se determina la absorbancia de UV (por duplicado).

La lectura de absorbancia inicial se compensa con respecto al aumento de volumen y se usa el siguiente cálculo para establecer el porcentaje de solubilidad:

30

$$\frac{\text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \times 100 = \text{porcentaje soluble}$$

Los resultados se muestran en la Tabla 1, en la que Glucagón-Cex representa el glucagón de tipo silvestre (SEC ID N°: 1) más una adición carboxilo terminal de SEC ID N°: 19 y Glucagón-Cex R<sup>12</sup> representa SEC ID N°: 43 más una adición carboxilo terminal de SEC ID N°: 19.

35

**Tabla 1 Datos de solubilidad para análogos de glucagón**

Análogo	Porcentaje Soluble
Glucagón	16
Glucagón-Cex, R12	104
Glucagón-Cex	87
Oxintomodulina 1	04
Glucagón, Cys17PEG5K	94
Glucagón, Cys21PEG5K	105
Glucagón, Cys24PEG5K	133

40

## EJEMPLO 12

## Ensayo de unión del receptor de glucagón

5 La afinidad de los péptidos por el receptor de glucagón se midió en un ensayo de unión de competición utilizando tecnología de ensayo de proximidad de centelleo. Se mezclaron diluciones 3 veces en serie de los péptidos realizados en tampón de ensayo de proximidad de centelleo (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, albúmina de suero bovino 0,1 % p/v) en una placa de fondo blanco/transparente de 96 pocillos (Coming Inc., Acton, MA) con 0,05 nM (3-[<sup>125</sup>I]-yodotirosilo) Tyr10 glucagón (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6 microgramos por pocillo, fragmentos de membrana plasmática preparados a partir de células que sobreexpresaban el receptor de glucagón humano y 1 mg/pocillo de perlas de ensayo de proximidad de centelleo de aglutinina de tipo A de germen de trigo tratado con polietilénimina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Después de 5 min de agitación a 800 rpm en un agitador rotatorio, la placa se incubó durante 12 h a temperatura ambiente y después se leyó en un contador de centelleo líquido MicroBeta1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Se midió la radiactividad unida de forma no específica (NSB) en los pocillos con 4 veces más concentración del ligando nativo "frío" que la mayor concentración en muestras de ensayo y se detectó radiactividad unida total en los pocillos sin competidor. Se calculó el porcentaje de unión específica de la siguiente manera: % de Unión Específica = ((NSB-Unida)/(NSB-Unida total)) x 100. Se determinaron los valores de CI50 usando software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

## EJEMPLO 13

## Ensayo funcional – Síntesis de AMPc

25 Se midió la capacidad de los análogos de glucagón para inducir AMPc en un ensayo indicador basado en luciferasa de luciérnaga. Se privó de suero a células HEK293 co-transfectadas con receptor de glucagón o GLP-1 y gen de luciferasa unido a un elemento sensible a AMPc cultivando durante 16 h en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con Suero de Crecimiento Bovino 0,25 % (HyClone, Logan, UT) y después se incubó con diluciones en serie de glucagón, GLP-1 o análogos de glucagón nuevos durante 5 h a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5 % en placas "Biocoat" recubiertas con poli-D-lisina de 96 pocillos (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación se añadieron 100 microlitros de reactivo de sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) a cada pocillo. La placa se agitó brevemente, se incubó 10 min en la oscuridad y se midió la producción de luz en el contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Se calcularon las concentraciones eficaces al 50 % usando software Origin (OriginLab, Northampton, MA). Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

35

Tabla 2

Inducción de AMPc por análogos de glucagón con extensión C-terminal				
Péptido	Inducción de AMPc			
	Receptor de glucagón		Receptor de GLP-1	
	CE <sub>50</sub> , nM	N*	CE <sub>50</sub> , nM	N
Glucagón	0,22 ± 0,09	14	3,85 ± 1,64	10
GLP-1	2214,00 ± 182,43	2	0,04 ± 0,01	14
Glucagón Cex	0,25 ± 0,15	6	2,75 ± 2,03	7
Oxintomodulina	3,25 ± 1,65	5	2,53 ± 1,74	5
Oxintomodulina KRNR	2,77 ± 1,74	4	3,21 ± 0,49	2
Glucagón R12	0,41 ± 0,17	6	0,48 ± 0,11	5
Glucagón R12 Cex	0,35 ± 0,23	10	1,25 ± 0,63	0
Glucagón R12 K20	0,84 ± 0,40	5	0,82 ± 0,49	5
Glucagón R12 K24	1,00 ± 0,39	4	1,25 ± 0,97	5
Glucagón R12 K29	0,81 ± 0,49	5	0,41 ± 0,24	6
Glucagón Amida	0,26 ± 0,15	3	1,90 ± 0,35	2
Oxintomodulina G24	2,54 ± 0,63	2	5,27 ± 0,26	2
Oxintomodulina C24 PEG 20K	0,97 ± 0,04	1	1,29 ± 0,11	1
* - número de experimentos				

**Tabla 3 Inducción de AMPc por análogos de glucagón pegilados**

Péptido	Inducción de AMPc			
	Receptor de glucagón		Receptor de GLP-1	
	CE <sub>50</sub> , nM	N*	CE <sub>50</sub> , nM	N
Glucagón	0,33 ± 0,23	18	12,71 ± 3,74	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,82 ± 0,15	4	55,86 ± 1,13	2
Glucagón C21 PEG 5K	0,37 ± 0,16	6	11,52 ± 3,68	2
Glucagón C24 PEG 5K	0,22 ± 0,10	12	13,65 ± 2,95	4
Glucagón C29 PEG 5K	0,96 ± 0,07	2	12,71 ± 3,74	2
Glucagón C24 PEG 20K	0,08 ± 0,05	3	No determinado	
Dímero de Glucagón C24	0,10 ± 0,05	3	No determinado	
GLP-1	>1000	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02	4
* - número de experimentos				

EJEMPLO 14

5 Ensayo de estabilidad para análogos de glucagón Cys-maleimido PEG

10 Cada análogo de glucagón se disolvió en agua o PBS y se realizó un análisis de HPLC inicial. Después de ajustar el pH (4, 5, 6, 7), las muestras se incubaron durante un periodo de tiempo específico a 37 °C y se volvieron a analizar por HPLC para determinar la integridad del péptido. Se determinó la concentración del péptido de interés específico y se calculó el porcentaje restante intacto en relación con el análisis inicial. Los resultados para Glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG5K se muestran en las Figs. 1 y 2.

LISTADO DE SECUENCIAS

15 <110> DiMarchi, Richard  
Smiley, David

<120> Análogos de glucagón que muestran solubilidad y estabilidad fisiológica

20 <130> 29920-201129

<150> 60/734.307

<151> 07-11-2005

25 <160> 45

<170> PatentIn versión 3.3

30 <210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

35 <400> 1

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 . . . . . 5 . . . . . 10 . . . . . 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
20 . . . . . 25

40 <210>2

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de glucagón

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

5 <222> (12)..(12)

<223> Xaa es Lys o Arg

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

10 <222> (21)..(21)

<223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

15 <222> (27)..(27)

<223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 2

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr  
20 25

20

<210>3

<211> 29

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de glucagón

30

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Lys o Arg

35

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)

<223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

40

<220>

<221 > MISC\_FEATURE

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es Met, Leu o Nle

45

<400> 3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr  
20 25

50

<210>4

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 507 098 T3

<220>  
 <223> Análogo de glucagón

5 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

10 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

15 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

20 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

25 <400> 4

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

30 <210>5  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

<400> 5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Thr  
 20 25

40 <210>6  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

50 <220>  
 <221 > MOD\_RES  
 <222> (17)..(17)  
 <223> pegilación

ES 2 507 098 T3

<400> 6

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Cys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
20 25

5 <210>7  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Análogo de glucagón

<220>  
15 <221> MOD\_RES  
<222> (21)..(21)  
<223> pegilación

<400>7

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
20 25

25 <210>8  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Análogo de glucagón

30 <220>  
<221> MOD\_RES

<222> (24)..(24)  
<223> pegilación

35 <400> 8

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr  
20 25

40 <210>9  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Análogo de glucagón

<220>

<221 > MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> pegilación

5 <400> 9

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Cys  
 20 25

10 <210> 10  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

20 <400> 10

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Lys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

25 <210> 11  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

35 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

40 <400> 11

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Lys Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

45 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Análogo de glucagón

5 <400> 12

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

10 <210> 13  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Análogo de glucagón

<220>  
<221 > MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(27)  
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

20 <400> 13

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20 25

25 <210> 14  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Análogo de glucagón

35 <220>  
<221 > MISC\_FEATURE  
<222> (27)..(27)  
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 14

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

40 <210> 15  
<211> 29  
<212> PRT  
45 <213> Secuencia artificial

ES 2 507 098 T3

<220>  
<223> Análogo de glucagón

<400> 15

5

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Lys Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Thr  
20 25

<210> 16  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Análogo de glucagón

15

<400> 16

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Lys Trp Leu Leu Asn Thr  
20 25

<210> 17  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Análogo de glucagón

25

<400> 17

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Leu Asn Thr  
20 25

30

<210> 18  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35

<220>  
<223> Análogo de glucagón

40

<400> 18

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Leu Asn Thr  
20 25

ES 2 507 098 T3

<210> 19  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> fragmento peptídico que representa los 10 aminoácidos carboxilo terminales de Exendina-4  
 <400> 19  
 10  
                   Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
                   1                  5                  10  
 <210> 20  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> fragmento peptídico que representa los 8 aminoácidos carboxilo terminales de oxintomodulina  
 20  
 <400> 20  
                   Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala  
                   1                  5  
 25  
 <210> 21  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> fragmento peptídico que representa los 4 aminoácidos carboxilo del extremo carboxilo terminal de oxintomodulina  
 <400> 21  
 35  
                   Lys Arg Asn Arg  
                   1  
 <210> 22  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Análogo de glucagón  
 45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle  
 50  
 <400> 22  
                   His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
                   1                  5                  10                  15  
                   Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr  
                   20                  25  
 55

<210> 23  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Análogo de glucagón  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Lys o Cys  
 10  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys o Cys  
 15  
 <400> 23  
 20  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 <210> 24  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Análogo de glucagón  
 30  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg  
 35  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle  
 45  
 <400> 24  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 50  
 <210> 25  
 <211> 37

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 5 <223> Análogo de glucagón  
  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 10 <223> Xaa es Lys o Arg  
  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 15 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina  
  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 20 <223> Xaa es Met, Leu o Nle  
  
 <400> 25  
  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
  
 Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30  
  
 Arg Asn Asn Ile Ala  
 35  
 25  
 <210> 26  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
 <220>  
 <223> Análogo de glucagón  
  
 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 35 <223> Xaa es Lys o Cys  
  
 <400> 26  
 40  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
  
 Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
  
 <210> 27  
 <211> 29  
 45 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Análogo de glucagón  
 50

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys o Cys

5

<400> 27

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

10 <210> 28

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Análogo de glucagón

<400> 28

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Cys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

20

<210> 29  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25

<220>  
 <223> Análogo de glucagón

30 <400> 29

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

35 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

45 <220>  
 <221 > MOD\_RES  
 <222> (24)..(24)  
 <223> 2-butilolactona unida mediante grupos tio de cys

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

5 <210> 31  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

<220>  
 <221 > MOD\_RES  
 15 <222> (24)..(24)  
 <223> grupo carboximetilo unido mediante grupo tiol de cys

<400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

25 <210> 32  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Análogo de glucagón

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

35 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

40 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nie

50 <400> 32

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

5 <210> 33  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

15 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

20 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

25 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 33

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

30 <210> 34  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

40 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

5  
 <400> 34

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg

10 <210> 35  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

20 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

25 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 35

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg

35 <210> 36  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 36

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

5 <210> 37  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

<220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 15 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 37

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

20 <210> 38  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Análogo de glucagón

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

35 <400> 38

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

5 <210> 39  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

15 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 39

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
 35

20 <210> 40  
 <211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 40

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

Arg

35 <210>41

<211> 33  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

10 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 41

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn  
 20 25 30

15 Arg

<210> 42  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

25 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

35 <400> 42

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Leu Asn Thr  
 20 25

40 <210> 43  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

<400> 43

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25

5 <210> 44  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

15 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 44

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr  
 20 25

20 <210> 45  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Análogo de glucagón

30 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(12)  
 <223> Xaa es Lys o Arg

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(21)  
 <223> Xaa es Asp, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

40 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24).  
 <223> Xaa es Gln, Lys, Cys, orn, homocisteína o acetil fenilalanina

45 <220>  
 <221 > MISC\_FEATURE  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 45

ES 2 507 098 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser  
1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Xaa Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr  
20 25

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende (i) SEC ID N°: 1 sustituida con una cisteína en la posición 24 en la que una cadena de polietilenglicol (PEG) está unida covalentemente a la cadena lateral de la Cys en la posición 24 del péptido o (ii) SEC ID N°: 1 sustituida con una cisteína en la posición 24 en la que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de la Cys en la posición 24 del péptido y una, dos o tres sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de las posiciones 5, 7, 10, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 28 y 29, en las que las una, dos o tres sustituciones de aminoácidos se seleccionan de
- a. Ala, Ser, Pro o Gly en la posición 5;
  - b. Ala, Ser, Pro o Gly en la posición 7;
  - c. Fe, Trp o acetil fenilalanina en la posición 10;
  - d. His, Arg u Orn en la posición 12;
  - e. Phe, Trp o acetil fenilalanina en la posición 13;
  - f. Met, Ile, Val, Cys, Nle u homocisteína en la posición 14;
  - g. His, Lis u Orn en la posición 17;
  - h. His, Lis u Orn en la posición 18;
  - i. Ser, Thr, Pro, o Gly en la posición 19;
  - j. Asp, Asn o Glu en la posición 20;
  - k. Asn, Glu o Gln en la posición 21;
  - l. Asp, Glu o Aln en la posición 28; y
  - m. Ala, Ser, Pro o Gly en la posición 29
- en donde el péptido estimula la actividad del receptor de glucagón, como se mide por la producción de AMPc usando el ensayo descrito en el Ejemplo 13, y sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido.
2. El péptido de la reivindicación 1, en el que la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de 1.000 a 5.000 Dalton.
3. El péptido de la reivindicación 1, en el que la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular mayor de 5.000 Dalton, opcionalmente mayor de 10.000 Dalton.
4. El péptido de la reivindicación 1, en el que el aminoácido en la posición 12 es Arg y el aminoácido en la posición 17 es Lys.
5. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el aminoácido C-terminal del péptido comprende un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico del aminoácido nativo.
6. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el aminoácido 29 del péptido está unido covalentemente con un segundo péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 19, SEC ID N°: 20 y SEC ID N°: 21.
7. El péptido de la reivindicación 6, en donde el segundo péptido es SEC ID N°: 19 y el aminoácido terminal del péptido comprende un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico del aminoácido nativo.
8. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 8.
9. Un multímero, opcionalmente un homodímero, en el que el multímero u homodímero comprenden dos o más péptidos de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores unidos entre sí mediante un enlazador.
10. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, un multímero de la reivindicación 9, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, que comprende además insulina, para regular los niveles de glucosa en sangre en pacientes insulino dependientes.
12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11, en donde la composición farmacéutica es una solución acuosa pre-formulada para el tratamiento de hipoglucemia, opcionalmente, estando la composición pre-envasada en una jeringa para administración parenteral.
13. Un kit adecuado para administrar un agonista de glucagón a un paciente que lo necesite, comprendiendo dicho kit un péptido o una composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, instrucciones para su uso y opcionalmente una jeringa y una aguja, un recipiente o un dispositivo dosificador de aerosol, en donde la composición está pre-envasada dentro del dispositivo de aerosol.

14. El péptido o composición de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para uso en el tratamiento de la hipoglucemia, para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal, o para reducir o mantener el peso corporal, opcionalmente, en donde el péptido está unido covalentemente con un PEG que tiene un peso molecular de más de 10.000 Dalton y opcionalmente en donde el péptido se usa junto con insulina.

Fig. 1: Estabilidad de glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub> (37 °C)

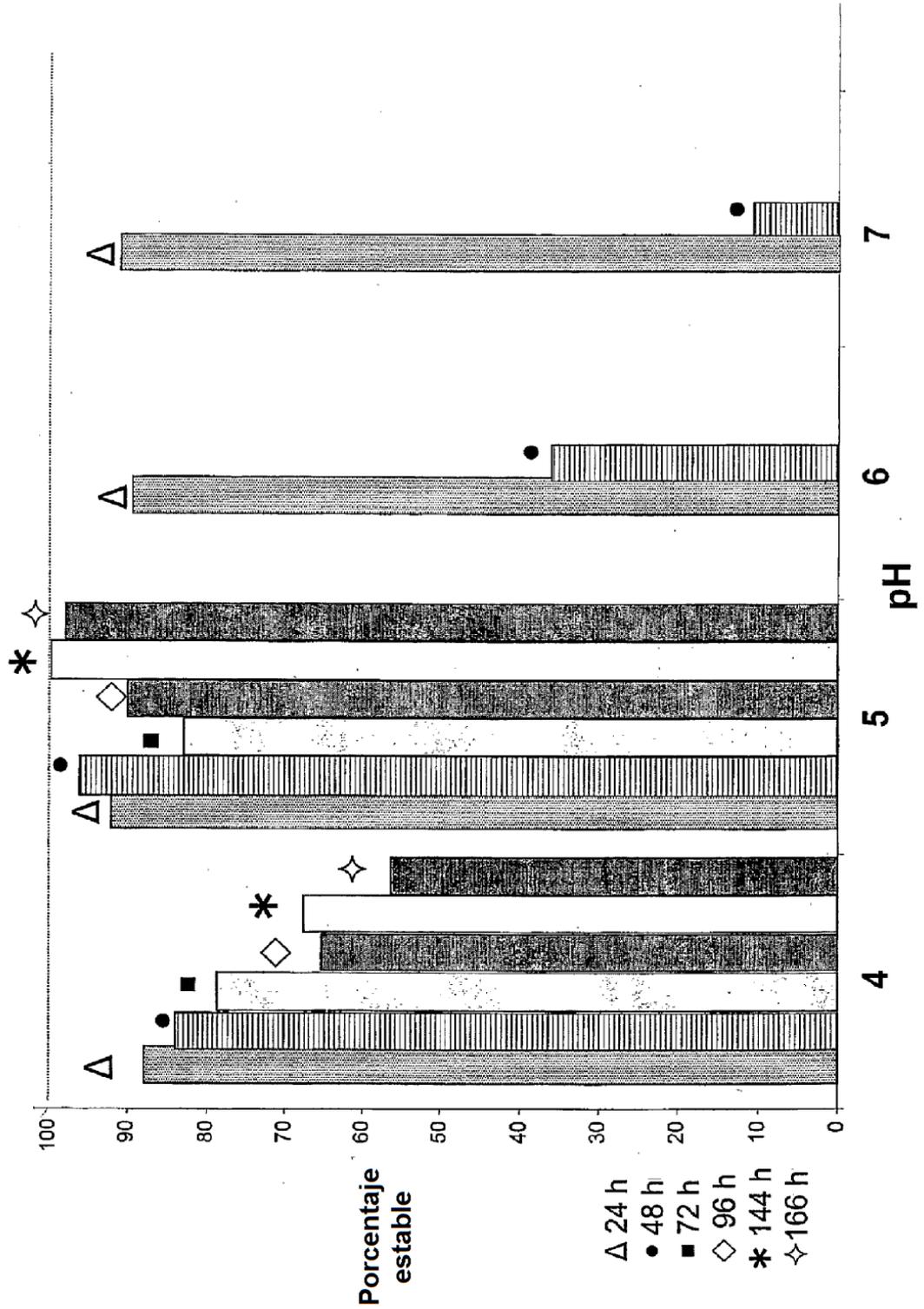


Fig. 2: Análisis de HPLC de glucagón Cys<sup>21</sup>-maleimidoPEG<sub>5K</sub>  
a pH 5 (37 °C)

