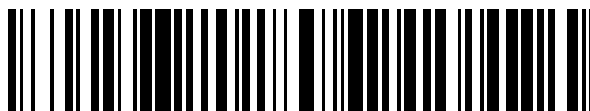


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 509 883**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.10.2008** **E 08845852 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.07.2014** **EP 2217701**

54 Título: **Antagonistas de glucagón**

30 Prioridad:

30.10.2007 US 983783 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.10.2014

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
YANG, BIN**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 509 883 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

Antagonistas de glucagón

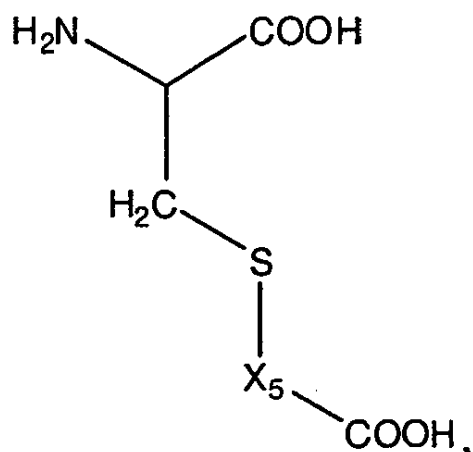
ANTECEDENTES

- 5 [0001] El glucagón nativo es un péptido de 29 aminoácidos que regula los niveles de glucosa en sangre mediante el aumento de la síntesis y la movilización de glucosa en el hígado. En consecuencia, la supresión de la acción del glucagón endógeno ha sido un objetivo para el desarrollo de fármacos para tratar afecciones caracterizadas por una producción excesiva de glucosa, tal como la diabetes.
- 10 [0002] El glucagón generalmente funciona como una hormona contrareguladora, oponiéndose a las acciones de la insulina, para mantener el nivel de glucosa en sangre, en particular en casos de hipoglucemia. Sin embargo, en algunos pacientes con diabetes tipo 1 o tipo 2, se ha demostrado que los niveles absolutos o relativos elevados de glucagón contribuyen al estado hiperglucémico. Tanto en animales de control sanos como en modelos animales de la diabetes tipo 1 y tipo 2 y, la eliminación de glucagón circulante con anticuerpos selectivos y específicos ha dado como resultado la reducción del nivel glucémico (Brand et al., Diabetologia 37, 985 (1994); Diabetes 43, [supl. 1], 172A (1994); Am. J. Physiol. 269, E469-E477 (1995); Diabetes 44 [supl. 1], 134A (1995); Diabetes 45, 1076 (1996)). Estos estudios sugieren que el antagonismo del glucagón podría ser útil en el control glucémico de la diabetes.
- 15 [0003] El glucagón ejerce su acción uniéndose a su receptor y activando al mismo, que es parte de la rama de glucagón-secretina de la familia de receptores acoplados a proteína G con 7 dominios transmembrana. El receptor funciona mediante la activación de la adenilato ciclasa que da lugar a un aumento de los niveles de AMPc. En informes anteriores se han identificado antagonistas de glucagón a base de péptidos, (ver Unson, CG et al. (1989) J. Biol. Chem. 264, 789-94, Ahn, J. et al. (2001) J. Peptide Research 58, 151-8 y Ahn J. et al. (2001) J. Med. Chem. 44, 1372-9), así como antagonistas de glucagón a base de nucleótidos (Balandra K. et al. (2004) J. Clinical Invest. 113, 1571-1581). La inhibición a base de péptidos actúa a nivel de unión del receptor, mientras que las últimas funciones actúan mediante la supresión de ARNm intracelular específico para el receptor del glucagón.
- 20 [0004] Se han descrito inhibidores del receptor de glucagón, y generalmente, se basan en la secuencia de aminoácidos del glucagón. Se han descrito varios análogos en los que uno o más aminoácidos se han eliminado o sustituido para producir potentes antagonistas del receptor de glucagón, por ejemplo, [des His¹] [Glu⁹]-glucagón amida (Unson et al., (1989) Peptides 10, 1171; Post et al., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 1662), des His¹, Phe⁶ [Glu⁹]-glucagón amida (Azizh et al., (1995.) Bioorg. & Med. Chem. Lett. 16, 1849) y Nle⁹, Ala^{11,16}-glucagón amida (Unson et al. (1994) J. Biol. Chem. 269 (17), 12548). Otros análogos incluyen sustituciones en las posiciones 4 (Ahn JM et al. (2001) J. Pept. Res. 58 (2): 151- 8), 1 (Dharanipragada, R. et al. (1993) Int. J. Pept. Res. 42 (1): 68-77) y 4, 5, 12, 17 y 18 en la secuencia del glucagón (Gysin B et al. 1986. Biochemistry 25 (25): 8278-84).
- 25 [0005] Tal como se describe aquí, se proporcionan antagonistas de glucagón de alta potencia que representan modificaciones del péptido de glucagón nativo. Más particularmente, el nuevo antagonista de glucagón representa nuevas modificaciones químicas del extremo N-terminal de la secuencia de glucagón nativo, produciendo un antagonista altamente específico que no muestra ninguna actividad agonista aparente. Estos compuestos se pueden usar en cualquier situación en la que se desea la supresión del agonismo del glucagón. Según una realización, los compuestos se pueden usar en el tratamiento de la diabetes.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

- 45 [0006] Según una realización, se proporcionan análogos de glucagón que tienen actividades antagonistas de glucagón puras. Los antagonistas de glucagón se utilizarían en cualquier situación en la que se desea la supresión del agonismo del glucagón. El uso más inmediato y obvio sería en el tratamiento de la diabetes donde el antagonismo del glucagón se ha demostrado en modelos preclínicos de hiperglucemia para producir una disminución de la glucosa en sangre. Estos antagonistas de glucagón se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad biofísica y/o la solubilidad acuosa de los compuestos, mientras se mantiene la actividad antagonista del compuesto original.
- 50 [0007] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón nativo que ha sido modificado mediante la delección de los primeros 2 - 5 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal, y una sustitución de ácido aspártico en la posición 9 del péptido nativo con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido β-homoglutámico, un derivado de ácido sulfónico de cisteína, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:
- 55

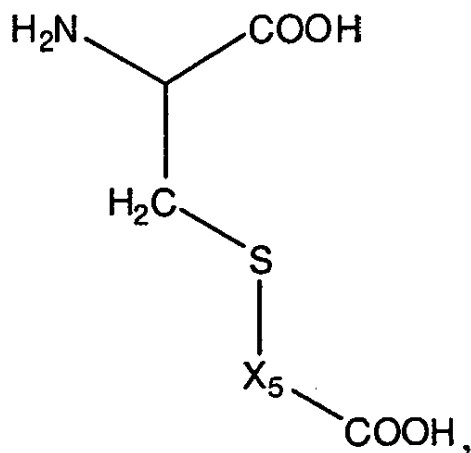
60



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄.

[0008] En una realización, el derivado de ácido sulfónico de la cisteína es ácido cisteico o ácido homocisteico. En una realización, el ácido carboxílico natural del aminoácido C-terminal se sustituye por un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster.

[0009] En otra realización, se proporciona un antagonista de glucagón (referido aquí como análogo PLA6) que comprende un péptido de glucagón nativo que ha sido modificado mediante la delección de los primeros 5 residuos de aminoácidos del extremo N-terminal, y la modificación del aminoácido N-terminal restante (fenilalanina) para reemplazar el grupo amino N-terminal nativo por un grupo hidroxilo (es decir, un ácido fenil-láctico N-terminal (PLA)). El análogo PLA6 aumenta tres veces la afinidad, y la potencia del antagonismo, en relación con un análogo que comprende una delección de los primeros cinco aminoácidos, pero conserva la fenilalanina nativa N-terminal. En una realización adicional, el residuo de ácido aspártico en la posición de las nueve de la proteína nativa está constituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido β-homoglutámico, un derivado de ácido sulfónico de cisteína, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄.

[0010] En una realización, el antagonista de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 38, y en una realización el antagonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 u 8.

[0011] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 37, en el que una cadena de polietilenglicol está unida covalentemente a un aminoácido en la posición 11, 12, 16, 19 ó 24, o en el aminoácido N o C-terminal del péptido. En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 12, en el que una cadena de polietilenglicol está unida covalentemente a un aminoácido en la posición 11 de la SEQ ID NO: 9, la posición 16 de la SEQ ID NO: 10, la posición 19 de la SEQ ID NO: 11 o en ambas posiciones 11 y 19 de SEQ ID NO:

12. En una realización, una sola cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons está unida covalentemente al péptido antagonista de glucagón. En otra realización, una sola cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20.000 Daltons está unida covalentemente al péptido antagonista de glucagón. Alternativamente, el antagonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 y tiene una cadena de polietilenglicol unida covalentemente a las posiciones de los aminoácidos 11 y 19, en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de polietileno es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons o es mayor que aproximadamente 20.000 Daltons.
- 5 **[0012]** En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón en el que el aminoácido carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40 está unido covalentemente a un segundo péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS). Estos compuestos se pueden modificar adicionalmente mediante la unión covalente de un grupo PEG al análogo de glucagón en una posición seleccionada de 11, 16, 19 para la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 40. En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón en el que el aminoácido carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39 o SEQ ID NO: 38 está unido covalentemente a un segundo péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 53.
- 10 **[0013]** En una realización, el antagonista de glucagón comprende la estructura ABC tal como se describe en el presente documento, en la que
A se selecciona del grupo que consiste en:
(i) ácido fenil láctico (PLA);
(ii) un derivado oxi de PLA;
(iii) un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter;
25 B representa los aminoácidos i a 26 de la SEQ ID NO: 1, en el que i es 3, 4, 5, 6, ó 7, que opcionalmente comprenden una o más modificaciones de aminoácidos, tal como se describe adicionalmente en este documento; y
C se selecciona del grupo que consiste en:
(x) X;
30 (xi) X-Y;
(xii) X-Y-Z; y
(xiii) X-Y-Z-R10,
en el que X es Met, Leu, o Nle; Y es Asn o un aminoácido cargado; Z es Thr, Gly, Cys, Lys, ornitina (Orn), homocisteína, acetil fenilalanina (Ac-Phe), o un aminoácido cargado; en el que R10 se selecciona de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 19-21 y 53; y
35 (xiv) cualquiera de (x) a (xiii) en que el carboxilato C-terminal está sustituido por una amida.
- [0014]** En otra realización, la solubilidad de cualquiera de los antagonistas de glucagón precedentes que carecen de uno a cinco aminoácidos N-terminales de glucagón nativo y/o comprende PLA puede mejorarse mediante la modificación del péptido mediante sustituciones y/o adiciones que introducen un aminoácido cargado en la parte C-terminal del péptido, preferiblemente en una posición C-terminal con respecto a la posición 22 del antagonista de glucagón. Opcionalmente, se pueden introducir uno, dos o tres aminoácidos cargados dentro de la parte C-terminal, preferiblemente C-terminal con respecto a la posición 22 (posición 27 de glucagón nativo). Según una realización, el aminoácido o aminoácidos nativos en las posiciones 23 y/o 24 están sustituidos por un aminoácido cargado, y/o en una realización adicional se añaden de uno a tres aminoácidos cargados al extremo C-terminal del péptido. En realizaciones de ejemplo, uno, dos o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En una realización, el antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 se modifica adicionalmente para incluir una sustitución de aminoácido ácido en la posición 23 y/o 24. En una realización, el aminoácido ácido es un residuo de ácido aspártico o ácido glutámico, y el antagonista del glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 41.
- 50 **[0015]** En una realización adicional, la estabilidad de los antagonistas de glucagón que carecen de los aminoácidos 1-5 de glucagón nativo y/o comprende PLA a pH fisiológico se puede mejorar mediante la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición 10 (posición 15 de glucagón nativo) por un amino ácido seleccionado del grupo que consiste en Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico. Según una realización, dicho antagonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 36 o SEQ ID NO: 40.
- 55 **[0016]** Cualquiera de los antagonistas de glucagón descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para comprender uno o más aminoácidos α,α -disustituidos en las posiciones que retienen la actividad deseada. En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 24 ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) del antagonista del glucagón están sustituidas por un aminoácido α,α -disustituido. Por ejemplo, el antagonista del glucagón puede comprender una sustitución de la posición 16 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) por ácido amino isobutírico (AIB). En algunas realizaciones, una, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 ó 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) están sustituidas por AIB. En un aspecto específico, el antagonista del glucagón que comprende uno o más aminoácidos α,α -disustituidos comprende además un carboxilato C-terminal.
- 60
65

[0017] Cualquiera de los antagonistas de glucagón descritos en este documento puede modificarse adicionalmente para comprender un grupo acilo y/o un grupo alquilo, cuyo grupo acilo o alquilo está unido a un aminoácido de un espaciador o al antagonista de glucagón a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida o alquilamina, tal como se describe en el presente documento.

[0018] Cualquiera de los antagonistas de glucagón descritos en este documento puede modificarse adicionalmente por truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos del extremo C-terminal del péptido de glucagón (es decir, la posición 29 o las posiciones 28 y 29 del péptido de glucagón nativo).

[0019] Se pueden realizar modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservadoras, al antagonista de glucagón que aún permita que se mantenga su actividad antagonista del glucagón. Por lo tanto, la presente invención contempla que cualquiera de los análogos de glucagón descritos en este documento se puede modificar adicionalmente para comprender hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 modificaciones de aminoácidos adicionales, y todavía mantener el nivel deseado de actividad de un antagonista del glucagón en el receptor de glucagón.

[0020] Los dímeros de los antagonistas de glucagón descritos en el presente documento también están comprendidos por la presente descripción. En una realización, se proporciona un dímero de antagonistas de glucagón que comprende dos péptidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 40, en el que los dos antagonistas de glucagón están unidos el uno al otro a través de un enlazador unido independientemente a la posición 11 ó 19 de las respectivas cadenas de péptido.

[0021] Según una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende los nuevos antagonistas de glucagón descritos en este documento. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones que se esterilizan y están contenidos en varios envases. Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse adicionalmente como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para la administración de la composición a un paciente.

[0022] Según una realización, se proporciona un método para tratar la hiperglucemia rápidamente utilizando una composición acuosa pre-formulada. El método comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un nuevo antagonista de glucagón modificado de la presente descripción. En una realización, el antagonista de glucagón está pegilado y la cadena de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Daltons. En una realización, la solución de glucagón modificado está preenvasada en un dispositivo que se utiliza para administrar la composición al paciente que sufre de la hiperglucemia.

[0023] Según una realización, se proporciona un método mejorado de regulación de 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 nuevo antagonista de glucagón modificado de la presente descripción, en el que dichas etapas de administración se realizan dentro de doce horas de diferencia. En una realización, el antagonista de glucagón y la insulina son co-administrados como una composición única, en el 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 Daltons.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico de barras que representa la estabilidad de Glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{SK} a 37°C incubado durante 24, 48, 72, 96, 144 y 166 horas, respectivamente.

La figura 2 representa los datos generados a partir del análisis de HPLC de Glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{SK} a pH 5 incubado a 37°C durante 24, 72 ó 144 horas, respectivamente.

La figura 3 representa los datos generados a partir de un ensayo de unión para los análogos de antagonistas de glucagón con ácido sulfónico truncado en N-terminal listados.

La figura 4 representa los datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los antagonistas peptídicos listados, medido mediante la producción de cAMP.

Las figuras 5A y 5B representan datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los análogos de glucagón listados, medido mediante la producción de cAMP. Más particularmente, la figura 5A compara la inducción del receptor de glucagón por análogos de glucagón [E9]G(2-29) •, [hC9(SO₃H)]G(2-29) ▲, [hC9(SO₃H)]G(4-29) ▼, [hC9(SO₃H)]G(5-29) ◀ y [hC9(SO₃H)]G(6-29) ◀ relativa al glucagón nativo ■. La figura 5B proporciona datos sobre el efecto inhibidor de los mismos análogos en la inducción del receptor de glucagón por 0,2 nM de glucagón. Abreviaturas: E9 = una sustitución de ácido glutámico en la posición 9 con relación al glucagón nativo; G(X-29) = glucagón nativo truncado en N-terminal X - 1 aminoácidos; hC9(SO₃H) = ácido homocisteico en la posición 9, con relación al glucagón nativo.

La figura 6 representa el esquema sintético para la síntesis de Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH. El Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH se disuelve bien en DMF o NMP y se pueden incorporar directamente utilizando DIC/HOBt o HBTU/HOBt durante la síntesis de péptidos automatizada. Todos los análogos de antagonistas de glucagón de base hC9(SO₃H) se sintetizaron mediante la incorporación directa de la forma sódica de Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH en la síntesis de péptidos en fase sólida.

La figura 7 representa los datos que comparan la actividad de afinidad de unión y receptor del glucagón de antagonistas de glucagón que difieren en base a las modificaciones del aminoácido N-terminal ("residuo de 6" de glucagón nativo).

La figura 8 representa los datos generados midiendo el efecto inhibitor de los antagonistas de análogos de glucagón PLA sobre la inducción del receptor de glucagón por 0,8 nM de glucagón, medido mediante la producción de cAMP. Los análogos PLA probados incluyen [PLA6, E9]G(6-29) ●, [Ac-PLA6, E9]G(6-29) ▲, [PLA4, E9]G(4-29) ▼, [PLA5, E9]G(5-29) ◀, en comparación con la actividad del glucagón nativo ■ solo. Abreviaturas: E9 = una sustitución de ácido glutámico en la posición 9 con relación al glucagón nativo; G(Ac-PLA) = PLA acetilado.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

[0025] Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones establecidas a continuación.

[0026] Tal como se utiliza aquí, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE.UU. o listados en la Farmacopea de los EE.UU. para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

[0027] Tal como se utiliza aquí, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de compuestos que retienen la actividad biológica del compuesto original, y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Muchos de los compuestos descritos en este documento son capaces de formar sales de ácido y/o base debido a la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

[0028] Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas, incluyen a modo de ejemplo solamente, 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.

[0029] Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse 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 fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico, y similares.

[0030] Tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento" incluye la profilaxis del trastorno o afección específica, o alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específica y/o prevenir o eliminar dichos síntomas.

[0031] Tal como se utiliza aquí, una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un antagonista de glucagón se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente del péptido para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, un efecto deseado sería la prevención o el tratamiento de la hiperglucemia. La cantidad que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general de la persona, el modo de administración, y similares. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede determinarse por un experto en la materia usando experimentación de rutina.

[0032] El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra ruta, tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

[0033] Un "péptido de glucagón", tal como se utiliza aquí, incluye cualquier péptido que comprende, ya sea la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o cualquier derivado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, incluyendo sustituciones de aminoácidos, o modificaciones después de la traducción (por ejemplo, la metilación, la acilación, la ubiquitinación y similares) del péptido, que estimula la actividad del receptor del glucagón o GLP-1, medida mediante la producción de cAMP utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 13.

[0034] El término "antagonista de glucagón" se refiere a un compuesto que contrarresta la actividad del glucagón o previene la función de glucagón. Por ejemplo, un antagonista de glucagón muestra al menos el 60% de inhibición (por ejemplo, al menos el 70% de inhibición) y preferiblemente, al menos el 80% de inhibición, de la respuesta máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En una realización, el antagonista de glucagón muestra al menos el 90% de inhibición de la respuesta máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En una realización específica, el antagonista de glucagón muestra el 100% de inhibición de la respuesta máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. Además, un antagonista de glucagón a una concentración de aproximadamente 1 μ M muestra menos de aproximadamente el 20% de la actividad de agonista máxima alcanzada por glucagón en el receptor

de glucagón. En una realización, el antagonista de glucagón muestra menos de aproximadamente el 10% de la actividad de agonista máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En una realización específica, el antagonista de glucagón muestra menos de aproximadamente el 5% de la actividad de agonista máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En todavía otra realización específica, el antagonista de glucagón muestra el 0% de la actividad de agonista máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón.

[0035] Un "antagonista de glucagón puro" es un antagonista de glucagón que no produce ningún tipo de estimulación detectada de actividad del receptor de glucagón o GLP-1, medida mediante la producción de cAMP utilizando un ensayo de modelo *in vitro* validado, tal como el descrito en el Ejemplo 13. Por ejemplo, un antagonista de glucagón puro muestra menos de aproximadamente el 5% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, menos de aproximadamente el 1%, aproximadamente el 0%) de la actividad de agonista máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón y muestra menos de aproximadamente el 5% (por ejemplo, menos de aproximadamente el 4%, menos de aproximadamente el 3%, menos de aproximadamente el 2%, menos de aproximadamente el 1% y aproximadamente el 0%) de la actividad de agonista máxima alcanzada por GLP-1 en el receptor de GLP-1.

[0036] Tal como se utiliza aquí, un "antagonista de glucagón derivado" es un péptido que comparte más del 60% de identidad de secuencia de aminoácidos con el aminoácido de la SEQ ID NO: 1, pero se ha modificado para mostrar actividad antagonista de glucagón. Dichas modificaciones incluyen sustituciones o delecciones de aminoácidos, o modificaciones después de la traducción (por ejemplo, metilación, amidación, acilación, ubiquitinación, pegilación y similares) del péptido. En un ejemplo, un antagonista de glucagón derivado comprende el péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 1 que ha sido modificado para tener los cinco primeros residuos de aminoácidos eliminados del extremo N-terminal, y tiene el grupo amino del aminoácido N-terminal restante (fenilalanina) sustituido por un grupo hidroxilo.

[0037] Tal como se utiliza aquí, una "modificación" de aminoácido se refiere a una sustitución, adición o delección de un aminoácido, e incluye la sustitución por o la adición de cualquiera de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, así como aminoácido atípicos o no naturales. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos incluyen Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL), y Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Los aminoácidos atípicos se pueden adquirir de proveedores comerciales, sintetizarse *de novo*, o modificarse o derivatizarse químicamente a partir de aminoácidos naturales. Tal como se utiliza aquí, una "sustitución" de aminoácido se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente.

[0038] Tal como se utiliza aquí, el término "sustitución conservativa de aminoácidos" se define aquí como los intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

I. Residuos alifáticos pequeños, no polares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas:

Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Residuos polares cargados positivamente:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Residuos alifáticos grandes, no polares:

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

V. Residuos aromáticos grandes:

Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

[0039] Tal como se utiliza aquí, 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 lineal, representada por la fórmula general $H(OCH_2CH_2)_nOH$, en la que n es al menos 9. En ausencia de cualquier caracterización adicional, el término pretende incluir polímeros de etilenglicol con un peso molecular total promedio seleccionada en el intervalo de 500 a 40.000 Daltons. "Polietilenglicol" o "PEG" se usa en combinación con un sufijo numérico para indicar el peso molecular promedio aproximado de los mismos. Por ejemplo, PEG-5000 se refiere a polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio total de aproximadamente de 5000.

[0040] Tal como se utiliza aquí, el término "pegilado" y términos similares se refieren a un compuesto que ha sido modificado de su estado nativo mediante la unión de un polímero de polietilenglicol al compuesto. Un "antagonista de glucagón pegilado" es un antagonista de glucagón que tiene una cadena de PEG unida covalentemente al antagonista de glucagón.

[0041] Tal como se utiliza aquí, una referencia general a un péptido pretende abarcar péptidos que tienen los extremos amino y carboxilo modificados. Por ejemplo, una cadena de aminoácidos que comprende un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal pretende estar abarcado por una secuencia de aminoácidos que designa los aminoácidos estándar.

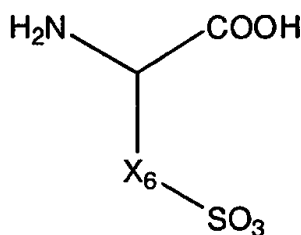
[0042] Tal como se utiliza aquí, un "enlazador" es un enlace, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los enlazadores pueden proporcionar el espaciado óptimo de las dos entidades, o pueden suministrar adicionalmente un enlace lábil que permite que las dos entidades estén separadas entre sí. Los enlaces

lábil incluyen grupos fotoescindibles, grupos lábiles a ácidos, grupos lábiles a bases y grupos escindibles por enzimas.

[0043] Tal como se utiliza aquí, un "dímero" es un complejo que comprende dos subunidades unidas covalentemente entre sí a través de un enlazador. El término dímero, cuando se utiliza en ausencia de cualquier 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.

[0044] Tal como se utiliza aquí, el término "ácido amino cargado" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que está cargada negativamente (es decir, desprotonada) o cargada positivamente (es decir, protonada) en solución acuosa a pH fisiológico. Por ejemplo, aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico, y ácido homoglutámico, mientras que los aminoácidos cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados incluyen los aminoácidos cargados entre los 20 aminoácidos que se encuentran habitualmente en proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o no naturales.

[0045] Tal como se utiliza aquí, un "derivado con ácido sulfónico de cisteína" se refiere a compuestos de la estructura general:



en la que X_6 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_4$ o alquínico $\text{C}_2\text{-C}_4$.

[0046] El término "alquilo $\text{C}_1\text{-C}_n$ ", en el que n puede ser de 1 a 6, tal como se utiliza aquí, representa un grupo alquilo lineal o ramificado que tiene de uno al número especificado de átomos de carbono. Los grupos alquilo $\text{C}_1\text{-C}_6$ típicos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n -propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo y similares.

[0047] Los términos "alquénico $\text{C}_2\text{-C}_n$ " en los que n puede ser de 2 a 6, tal como se utiliza aquí, representa un grupo ramificado o lineal olefinicamente insaturado que tiene de 2 al número especificado de átomos de carbono y al menos un doble enlace. Ejemplos de tales grupos incluyen, pero sin limitación, 1-propenilo, 2-propenilo ($\text{CH}_2\text{-CH=CH}_2$), 1,3-butadienilo, ($-\text{CH=CHCH=CH}_2$), 1-butenilo ($\text{CH=CHCH}_2\text{CH}_3$), hexenilo, pentenilo, y similares.

[0048] El término "alquínico $\text{C}_2\text{-C}_n$ ", en el que n puede ser de 2 a 6, se refiere a un grupo ramificado o lineal insaturado que tiene de 2 a n átomos de carbono y al menos un triple enlace. Ejemplos de tales grupos incluyen, pero sin limitación, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, y similares.

[0049] Tal como se utiliza aquí, el término "antagonista de glucagón estabilizado por pH" se refiere a un análogo de glucagón que presenta una estabilidad y solubilidad superior, en relación con el glucagón nativo, en tampones acuosos en el intervalo más amplio de pH utilizado para los propósitos farmacológicos.

[0050] Tal como se utiliza aquí, el término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido que comprende un segundo grupo ácido, incluyendo, por ejemplo, un grupo ácido sulfónico o ácido carboxílico.

[0051] Tal como se utiliza aquí, el término "paciente" sin más designación se pretende que abarque cualquier animal domesticado vertebrado de sangre caliente (incluyendo por ejemplo, pero sin limitación, animales de granja, caballos, gatos, perros y otros animales domésticos) y los seres humanos.

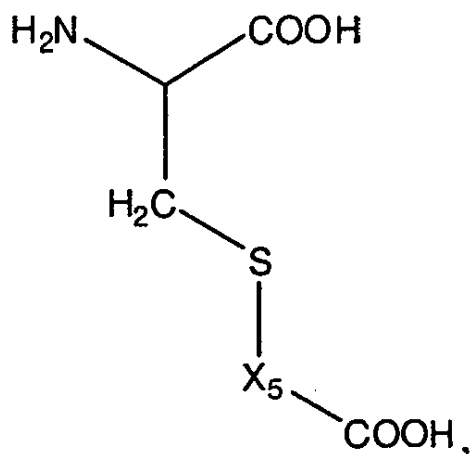
[0052] Tal como se utiliza aquí, el término "aproximadamente", tal como se utiliza aquí, significa mayor o menor que el valor o intervalo de valores indicados en un 10 por ciento, pero no pretende designar cualquier valor o intervalo de valores a sólo a esta definición más amplia. Cada valor o intervalo de valores precedidos por el término "aproximadamente" también pretende abarcar la realización del valor absoluto o intervalo de valores indicados.

REALIZACIONES

[0053] Se describen aquí antagonistas de glucagón que son altamente específicos para la supresión de glucagón y no poseen una actividad agonista aparente. Tales antagonistas de glucagón se utilizan en cualquier situación en la que se desea la supresión del agonismo del glucagón. Por ejemplo, los antagonistas de glucagón se pueden utilizar en el tratamiento de la diabetes en el que el antagonismo de glucagón se ha demostrado en modelos preclínicos de la hiperglucemia para producir una disminución de la glucosa en sangre.

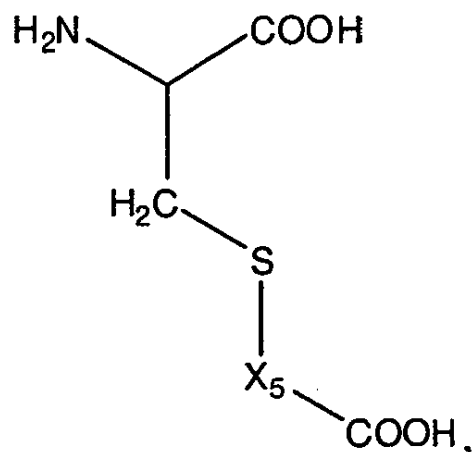
[0054] Se han desarrollado análogos específicos de glucagón en los que el ácido aspártico que aparece normalmente en la posición nueve ha sido sustituido por ácido glutámico o un derivado basado en ácido cisteico. Más en particular, la supresión del primer aminoácido (des-His) y la sustitución del ácido aspártico en la posición 9 por ácido glutámico producen un antagonista de glucagón. Los derivados de glucagón que tienen sustituyentes de ácido sulfónico sustituidos en la posición de aminoácido nueve de glucagón actúan de manera similar a los aminoácidos basados en ácido carboxílico, pero con algunas diferencias críticas en relación con propiedades físicas, tales como la solubilidad. El ácido homocisteico (hCysSO₃) cuando sustituye al ácido glutámico isostérico en la posición nueve en la des-His convencional, el antagonista de glucagón Glu9 conserva un antagonista parcial y un agonista débil.

[0055] Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que la eliminación de residuos N-terminales adicionales, incluyendo por ejemplo, la eliminación de los primeros cinco aminoácidos (que producen des(1-5), y la sustitución de la posición 9 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1) por hCys(SO₃), ácido homoglutámico, ácido β-homoglutamico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄, proporciona un compuesto que actúa como un antagonista hormonal que es altamente específico, potente y sin contaminar propiedades agonistas. Por consiguiente, se describen aquí péptidos derivados de glucagón que muestran actividad antagonista de glucagón pura. Según una realización, el antagonista de glucagón muestra actividad que reduce la producción de cAMP inducida por glucagón del receptor de glucagón en un máximo de al menos el 50% cuando el receptor de glucagón se pone en contacto simultáneamente con 0,8 nM de glucagón y el antagonista del glucagón, medida mediante la producción de cAMP en un ensayo *in vitro*. En una realización, el antagonista de glucagón reduce la producción de cAMP inducida por glucagón del receptor de glucagón en una cantidad máxima de al menos el 80%.

[0056] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón derivado que comprende un péptido de glucagón modificado, con respecto a la secuencia de tipo salvaje de la SEQ ID NO: 1, mediante la delección de dos a cinco residuos de aminoácidos del extremo N-terminal y la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición nueve de la proteína nativa por un ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido β-homoglutámico, un derivado con ácido sulfónico de cisteína, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



5
10
15

20 en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄.

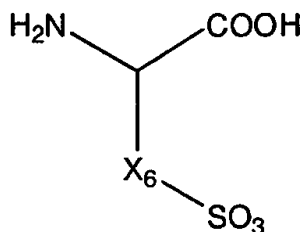
[0057] En una realización específica, el antagonista de glucagón que comprende la delección de dos a cinco residuos de aminoácidos del extremo N-terminal y la sustitución de Asp en la posición 9 del glucagón nativo, se modifica adicionalmente en hasta tres modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, el antagonista de glucagón puede comprender uno, dos, o tres modificaciones de aminoácidos conservadoras. Alternativamente o adicionalmente, el antagonista de glucagón puede comprender una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en:

- A. sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1), o el aminoácido N o C-terminal del antagonista de glucagón por un amino ácido unido covalentemente a un grupo acilo o un grupo alquilo a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida o alquilamina;
- B. sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21 y 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ IDNO: 1), o el aminoácido N o C-terminal del antagonista de glucagón por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetil-fenilalanina (Ac-Phe), en la que el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un grupo hidrófilo;
- C. adición de un aminoácido unido covalentemente a un grupo hidrófilo al extremo N o C-terminal del antagonista de glucagón;
- D. sustitución de Asp en la posición 15 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;
- E. sustitución de Ser en la posición 16 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;
- F. sustitución por AIB en una o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- G. delección del aminoácido en la posición 29 o los aminoácidos en las posiciones 28 y 29, según la numeración de la SEQ ID NO: 1;
- H. sustitución de cada uno o ambos de Asn en la posición 28 y Thr en la posición 29 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) por aminoácidos cargados; y/o la adición de uno a dos aminoácidos cargados en el extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1;
- I. sustitución de la Met en la posición 27 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) por Leu o norleucina;
- J. adición de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 19-21 y 53 al extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 1; en la que la Thr en la posición 29 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) es Thr o Gly; y
- K. sustitución del carboxilato C-terminal por una amida o éster.

[0058] En una realización específica, el antagonista de glucagón comprende una modificación de aminoácidos de A, B, o C, tal como se ha descrito anteriormente, o una combinación de las mismas. En todavía otra realización específica, el antagonista de glucagón comprende además una modificación de aminoácidos de cualquiera de D a K, tal como se ha descrito anteriormente, o una combinación de las mismas, además de la modificación o modificaciones de aminoácidos de A, B y/o C.

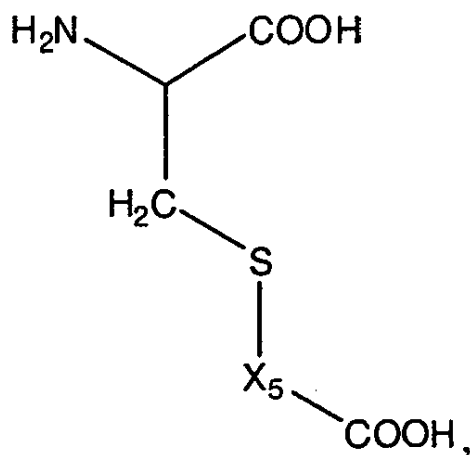
[0059] En una realización, el antagonista de glucagón comprende un péptido de glucagón, en el que los primeros 5 aminoácidos han sido eliminados del extremo N-terminal, y el grupo amino N-terminal restante ha sido sustituido por un grupo hidroxilo (el "análogo PLA6"), produciendo el péptido de SEQ ID NO: 39. Los solicitantes han encontrado que la sustitución del ácido fenil-láctico por fenilalanina en análogos de antagonistas de glucagón que tienen los primeros cinco aminoácidos suprimidos y la sustitución de un ácido glutámico en la posición 9 (en relación con el glucagón nativo) mejora aún más la potencia de estos análogos de antagonistas de glucagón.

[0060] En una realización, el péptido antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 39 se modifica adicionalmente mediante la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (la posición 9 del glucagón nativo) por un aminoácido de la estructura general:



en la que X_6 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_3$ o alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_3$, y en una realización X es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_3$, y en otra realización X es alquilo C_2 . En una realización, el antagonista de glucagón comprende un péptido de glucagón, en el que los primeros 5 aminoácidos han sido eliminados del extremo N-terminal, y el residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (la posición 9 del glucagón nativo) ha sido sustituido por ácido cisteico o ácido homocisteico. En una realización, el antagonista de glucagón comprende un péptido de glucagón que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En una realización, el antagonista de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, en la que el aminoácido en la posición cuatro es ácido homocisteico.

[0061] En otra realización, el antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 39 se modifica adicionalmente mediante la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (la posición 9 del glucagón nativo) por ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido β -homoglutámico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X_5 es alquilo $\text{C}_1\text{-C}_4$, alqueno $\text{C}_2\text{-C}_4$ o alquinilo $\text{C}_2\text{-C}_4$. En una realización específica, X es alquilo C_1 o C_2 .

[0062] Sin embargo, los solicitantes han descubierto que con la sustitución de la fenilalanina N-terminal por PLA en un análogo de glucagón des 1-5 (es decir, un análogo de glucagón que tiene los primeros cinco aminoácidos suprimidos), la sustitución adicional del residuo de ácido aspártico nativo en la posición cuatro (posición 9 del glucagón nativo) no es necesaria para producir un análogo que muestre antagonismo puro. Este resultado es sorprendente a la luz de las enseñanzas de la técnica anterior que el residuo de ácido aspártico nativo en la posición cuatro debe sustituirse para producir alta afinidad y potentes antagonistas de análogos de glucagón (2-29). El uso de la sustitución PLA mejora la potencia relativa del análogo Asp9 hasta un punto comparable con la de los análogos Glu9 y hCys(SO_3H)9, (véanse las Tablas 6 y 7 en los ejemplos).

[0063] La sustitución del residuo de fenilalanina por otros análogos de fenilalanina, incluyendo 3,4-2F-fenilalanina (3,4-2F-Phe), 2-naftilalanina (2-Nal), N-acil-fenilalanina (Ac-Phe), ácido alfa-metilhidrocinámico (MCA) y ácido bencilmalónico (BMA) no actuaron de forma tan potente como la sustitución PLA (ver figura 7).

[0064] Sustituyendo PLA en sitios distintos de la posición seis (según la numeración de aminoácidos del glucagón nativo), incluyendo en las posiciones 4 y 5, se observa que el análogo PLA6 es un antagonista apreciablemente más potente que los análogos de glucagón que tienen un extremo N-terminal ligeramente extendido (véanse los resultados

presentados en la Tabla 8 y figura 8). Los resultados presentados en la figura 8 también demuestran que la acilación del grupo hidroxilo de PLA no afecta a la potencia del análogo PLA6. Por consiguiente, la presente invención también incluye análogos en los que el grupo amino N-terminal está sustituido por un péptido "O-terminal" acilado y alquilado.

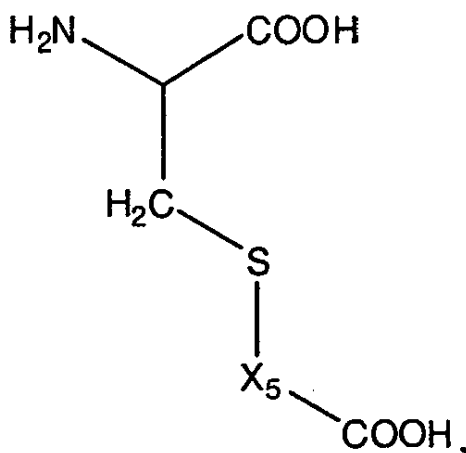
[0065] Además, la sustitución PLA6 no sólo aumenta la potencia del antagonista, sino que también tiene un papel crítico en la pegilación. Los análogos PLA6 se pueden pegar selectivamente sin restauración del agonismo de glucagón. En ausencia de la sustitución de PLA, la pegilación del análogo induce sorprendentemente el agonismo del glucagón. Este agonismo del glucagón no se observa en los análogos PLA6 pegilados. Se investigaron varios sitios para la pegilación, incluyendo las posiciones 3, 6 y 19 (posiciones 8, 11 y 19 de glucagón nativo) y en el residuo de aminoácido N-terminal (véase la Tabla 12). En una realización, la pegilación es en la posición 19 (posición 24 de glucagón nativo) ya que ese sitio muestra el antagonismo de glucagón más potente y selectivo.

[0066] En una realización, el antagonista de glucagón comprende la estructura general de A-B-C, en la que A se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) ácido fenil láctico (PLA);
- (ii) un derivado oxi de PLA;
- (iii) un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter;

B representa los aminoácidos i a 26 de la SEQ ID NO: 1, en el que i es 3, 4, 5, 6, ó 7, que comprende opcionalmente una o más modificaciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en:

- (iv) Asp en la posición 9 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) está sustituido por Glu, un derivado de ácido sulfónico de Cys, ácido homoglutámico, ácido β -homoglutámico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X_5 es alquilo C_1-C_4 , alquenilo C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 .

- (v) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) por un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida, o alquilamina;

- (vi) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetil-fenilalanina (Ac-Phe), en la que el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un grupo hidrófilo;

- (vii) Asp en la posición 15 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) está sustituido por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

- (viii) Ser en la posición 16 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) está sustituido por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

- (ix) sustitución por AIB en una o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y

C se selecciona del grupo que consiste en:

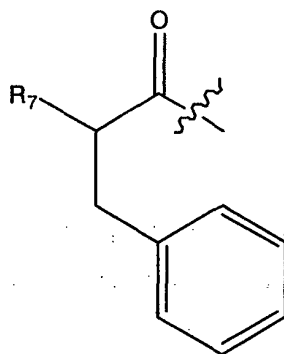
- (x) X;
- (xi) X-Y;
- (xii) X-Y-Z; y
- (xiii) X-Y-Z-R10,

en el que X es Met, Leu, o Nle; Y es Asn o un aminoácido cargado; Z es Thr, Gly, Cys, Lys, ornitina (Orn), homocisteína, acetil-fenilalanina (Ac-Phe), o un aminoácido cargado; en el que R10 se selecciona de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 19-21 y 53; y

- (xiv) cualquiera de (x) a (xiii) en que el carboxilato C-terminal está sustituido por una amida.

[0067] En un aspecto específico, el antagonista de glucagón comprende un derivado oxi de PLA. Tal como se usa aquí, "derivado oxi de PLA" se refiere a un compuesto que comprende una estructura modificada de PLA en la que el grupo hidroxilo ha sido reemplazado por O-R₁₁, en el que R₁₁ es un grupo químico. En este sentido, el derivado oxi de PLA puede ser, por ejemplo, un éster de PLA o un éter de PLA.

[0068] Los métodos de fabricación de derivados oxi de PLA son conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el derivado oxi es un éster de PLA, el éster puede formarse por reacción del hidroxilo de PLA con un carbonilo que lleva un nucleófilo. El nucleófilo puede ser cualquier nucleófilo adecuado, incluyendo, pero sin limitación, una amina o hidroxilo. Por consiguiente, el éster de PLA puede comprender la estructura de fórmula IV:



Fórmula IV

en la que R₇ es un éster formado por reacción del hidroxilo de PLA con un carbonilo que lleva un nucleófilo.

[0069] El carbonilo que lleva un nucleófilo (que reacciona con el hidroxilo de PLA para formar un éster) puede ser, por ejemplo, un ácido carboxílico, un derivado de ácido carboxílico, o un éster activado de un ácido carboxílico. El derivado de ácido carboxílico puede ser, pero sin limitación, un cloruro de acilo, un anhídrido de ácido, una amida, un éster, o un nitrilo. El éster activado de un ácido carboxílico puede ser, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), tosilato (Tos), una carbodiimida, o un hexafluorofosfato. En algunas realizaciones, la carbodiimida es 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), o 1,3-diisopropilcarbodiimida (DICD). En algunas realizaciones, el hexafluorofosfato se selecciona de un grupo que consiste en hexafluorofosfato de benzotriazol 1-il-oxi-tris(dimetilamino) fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol 1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio (HATU), y hexafluorofosfato de o-benzotriazol-N,N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU).

[0070] Los métodos de fabricación de éteres a partir de la reacción con un grupo hidroxilo (por ejemplo, el hidroxilo de PLA) también se conocen en la técnica. Por ejemplo, el grupo hidroxilo de PLA puede hacerse reaccionar con un alquilo halogenado o alcohol alquílico tosilado para formar un enlace éter.

[0071] Generalmente, el grupo químico de R₁₁ es aquel que no disminuye la actividad del antagonista de glucagón. En algunas realizaciones, el grupo químico aumenta la actividad, estabilidad y/o solubilidad del antagonista de glucagón.

[0072] En una realización específica, el grupo químico unido a PLA a través de un enlace que contiene oxígeno (por ejemplo, a través de un enlace éster o éter) es un polímero (por ejemplo, un polialquilenglicol), un carbohidrato, un aminoácido, un péptido, o un lípido, por ejemplo, un ácido graso o un esteroide.

[0073] En una realización específica, el grupo químico es un aminoácido, que, opcionalmente, es una parte de un péptido, de manera que la fórmula IV es un depsipéptido. En este sentido, PLA puede estar en una posición distinta al residuo de aminoácido N-terminal del antagonista de glucagón, de manera que el antagonista de glucagón comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) aminoácidos N-terminales al residuo PLA. Por ejemplo, el antagonista de glucagón puede comprender PLA en la posición n, en el que n es 2, 3, 4, 5, o 6 del antagonista de glucagón.

[0074] Los aminoácidos N-terminales al residuo PLA pueden ser sintéticos o naturales. En una realización específica, los aminoácidos que son N-terminales a PLA son aminoácidos naturales. En una realización, los aminoácidos que son N-terminal a PLA son los aminoácidos N-terminales de glucagón nativo. Por ejemplo, el antagonista del glucagón puede comprender en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 54-58, en las que PLA está unido a treonina mediante un enlace éster:

SEQ ID NO: 54 Su-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 55 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 56 Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 57 Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 58 Thr-PLA

[0075] En una realización alternativa, uno o más de los aminoácidos N-terminales pueden sustituirse por un aminoácido distinto del aminoácido de glucagón nativo. Por ejemplo, cuando el antagonista de glucagón comprende PLA como aminoácido en la posición 5 ó 6, el aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 1 del antagonista de glucagón es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, ácido alfa, alfa dimetilimidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil-histidina, ácido imidazolacético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metilserina, N-metilalanina y ácido aminoisobutírico (AIB). También, por ejemplo, cuando el antagonista de glucagón comprende PLA como aminoácido en la posición 4, 5, ó 6, el aminoácido en la posición 3 del antagonista de glucagón puede ser ácido glutámico, en oposición al residuo de glutamina nativo del glucagón nativo. En una realización de ejemplo de la invención, el antagonista de glucagón comprende en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 59-61.

[0076] Con respecto a los antagonistas de glucagón que comprenden un compuesto de Fórmula IV, el polímero puede ser cualquier polímero, siempre que pueda reaccionar con el grupo hidroxilo de PLA. El polímero puede ser aquel que, de forma natural o normal comprende un carbonilo que lleva un nucleófilo. Alternativamente, el polímero puede ser aquel que se haya derivado para comprender el carbonilo que lleva el carbonilo. El polímero puede ser un polímero derivado de cualquiera de: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos, incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquilenos, tereftalatos de polialquilenos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros vinílicos, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo), y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo alquilcelulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, y sal sódica de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno) y poli (tereftalato de etileno), y poliestireno.

[0077] El polímero puede ser un polímero biodegradable, incluyendo un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli (ácido valérico), y poli(láctido-cocaprolactona)), y un polímero natural biodegradable (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos, incluyendo dextrano y celulosas, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquilenos, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones realizadas rutinariamente por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrófilas (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan mediante hidrólisis enzimática o la exposición al agua in vivo, por erosión superficial o general.

[0078] El polímero puede ser un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por H.S. Sawhney, C. P. Pathak y J.A. Hubbell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

[0079] En una realización, el polímero es un polímero soluble en agua. Polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, hidroxipropiletilcelulosa, hidroxipropil butilcelulosa, hidroxipropil pentilcelulosa, metil celulosa, etil celulosa (Ethocel), hidroxietil celulosa, diversas alquil celulosas e hidroxialquil celulosas, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, copolímeros de acetato de vinilo/ácido crotonico, metacrilato de poli-hidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido metacrílico, polimetacrilato de metilo, copolímeros de anhídrido maleico/metil vinil éter, poli vinilalcohol, ácido poliacrílico sódico y cálcico, ácido poliacrílico, carboxi polímeros ácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxitileno y polioxiopropileno, anhídrido de polimetilviniléter co-maleico, carboximetilamida, co-polímero de metacrilato de potasio y divinilbenceno, polioxitilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

[0080] En una realización específica, el polímero es un polialquilenglicol, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

[0081] El hidrato de carbono puede ser cualquier hidrato de carbono siempre que comprenda o esté producido para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. El hidrato de carbono, por ejemplo, puede ser aquel que haya sido derivatizado para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. En este sentido, el hidrato de carbono puede ser una forma derivatizada de un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo,

sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano).

[0082] Con respecto a los antagonistas de glucagón que comprenden un compuesto de fórmula IV, el lípido puede ser cualquier lípido que comprenda un carbonilo con un grupo saliente alfa. El lípido, por ejemplo, puede ser aquel que se derivatiza para comprender el carbonilo. En este sentido, el lípido, puede ser un derivado de un ácido graso (por ejemplo, un ácido graso C4-C30, eicosanoide, prostaglandina, leucotrienos, tromboxano, N-acil etanolamina), glicerolípido (por ejemplo, mono, glicerol mono-, di-, trisustituidos), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ejemplo, esfingosina, ceramida), lípido esteroide (por ejemplo, esteroide, colesterol), lípido prenol, sacarolípido, o un policétido, aceite, cera, colesterol, esteroide, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

[0083] En una realización, R7 tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa o menos, por ejemplo, aproximadamente 90 kDa o menos, aproximadamente 80 kDa o menos, aproximadamente 70 kDa o menos, aproximadamente 60 kDa o menos, aproximadamente 50 kDa o menos, aproximadamente 40 kDa o menos. En consecuencia, R7 puede tener un peso molecular de aproximadamente 35 kDa o menos, aproximadamente 30 kDa o menos, aproximadamente 25 kDa o menos, aproximadamente 20 kDa o menos, aproximadamente 15 kDa o menos, aproximadamente 10 kDa o menos, aproximadamente 5 kDa o menos, o aproximadamente 1 kDa.

[0084] En una realización alternativa, el antagonista de glucagón comprende como A, un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter. El enlace éster o éter pueden ser, por ejemplo, entre los aminoácidos 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5, ó 5 y 6. Opcionalmente, el péptido puede ser modificado adicionalmente mediante enlace covalente a otro grupo químico que incluye la unión a un polímero (por ejemplo, un polímero hidrófilo), alquilación o acilación.

[0085] El péptido puede comprender cualquiera de los aminoácidos, sintéticos o naturales, siempre que al menos dos aminoácidos consecutivos del péptido estén unidos a través de un enlace éster o éter. En una realización específica, el péptido comprende los aminoácidos del glucagón nativo. Por ejemplo, el péptido puede comprender j a 6 de glucagón nativo (SEQ ID NO: 1), en la que j es 1, 2, 3, 4, ó 5. Alternativamente, el péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos basada en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 con una o más modificaciones de aminoácidos. El aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Por ejemplo, el péptido puede comprender en la posición 1 del antagonista de glucagón un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, ácido alfa, alfa dimetil imidiazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil-histidina, ácido imidazolacético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metilserina, N-metilalanina y ácido aminoisobutírico (AIB). También, por ejemplo, el aminoácido en la posición 3 del antagonista de glucagón puede ser ácido glutámico, en oposición al residuo de glutamina nativo del glucagón nativo. Por consiguiente, el antagonista de glucagón puede comprender una secuencia de aminoácidos de:

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 68);
Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 69); o
Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 70);

en la que Xaa₁ se selecciona de un grupo que consiste en: His, D-histidina, ácido alfa, alfa-dimetil imidiazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil-histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hidroxil histidina, acetil histidina y homo histidina; Xaa₂ se selecciona de un grupo que consiste en: Ser, D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina, N-metil alanina y ácido aminoisobutírico (AIB); y Xaa₃ es Gln o Glu.

[0086] La presente invención también abarca realizaciones en las que el aminoácido C-terminal de los antagonistas de glucagón tiene un grupo amida sustituyendo el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo.

[0087] Los antagonistas de glucagón se pueden modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico, manteniendo la actividad antagonista del glucagón. La introducción de grupos hidrófilos en las posiciones correspondientes a las posiciones 1, 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido nativo, o en el extremo C-terminal, puede mejorar la solubilidad del antagonista de glucagón resultante en soluciones que tienen un pH fisiológico, manteniendo la actividad antagonista de los compuestos originales. Por lo tanto, en una realización, los antagonistas de glucagón descritos en la presente se modifican adicionalmente para comprender uno o más grupos hidrófilos unidos covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 1, 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido de glucagón nativo o del aminoácido N o C-terminal. En una realización adicional, las cadenas laterales de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 16 y 24 del péptido de glucagón nativo están unidos covalentemente a grupos hidrófilos, y en una realización el grupo hidrófilo es polietilenglicol (PEG).

[0088] En algunas realizaciones, en las que el antagonista de glucagón está PEGilado, el antagonista de glucagón comprende los péptidos de glucagón acortados, específicamente 6-29 donde el aminoácido "N-terminal" es PLA (ácido

fenil-láctico). Dichos derivados de glucagón muestran ventajas únicas. Son péptidos más potentes que los que tienen la fenilalanina N-terminal nativa y suprimen cualquier agonismo de glucagón que resulta de la pegilación, algo que no se observa con la fenilalanina nativa. Finalmente, aunque la literatura actual establece que se requiere una sustitución del ácido aspártico nativo en la posición 9 para la actividad antagonista, los solicitantes han descubierto el sorprendente resultado de que dicha sustitución no es necesaria en análogos de glucagón PLA⁶-(6-29).

[0089] En una realización, un aminoácido del antagonista de glucagón está sustituido por al menos un residuo de cisteína, en el que la cadena lateral del residuo de cisteína está modificado adicionalmente con un reactivo que reacciona con tiol, incluyendo, por ejemplo, maleimido, vinil sulfona, 2-piridiltio, haloalquilo, y haloacilo. Estos reactivos que reaccionan con tiol pueden contener grupos carboxi, ceto, hidroxilo y éter, así como otros grupos hidrófilos, tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, un aminoácido del antagonista de glucagón está sustituido por lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina sustituyente está modificado adicionalmente utilizando reactivos que reaccionan con amina, tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc) de ácidos carboxílicos o aldehídos de grupos hidrófilos, tales como polietilenglicol. Según una realización, el residuo de lisina correspondiente a la posición 12 del péptido nativo está sustituido por arginina y una única sustitución de lisina está insertada por uno de los aminoácidos correspondientes a la posición 1, 16, 17, 20, 21, 24 ó 29 de el péptido nativo, o una lisina está añadida en los extremos N- o C-terminal del antagonista de glucagón.

[0090] En otra realización, el residuo de metionina correspondiente a la posición 27 del péptido nativo se cambia a leucina o norleucina para evitar la degradación oxidativa del péptido.

[0091] En algunas realizaciones, los antagonistas de glucagón descritos en el presente documento se modifican adicionalmente mediante truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos del extremo C-terminal del péptido de glucagón (es decir, el truncamiento del aminoácido en la posición 29 o en las posiciones 28 y 29 del glucagón nativo) sin afectar a la actividad y/o la potencia en el receptor de glucagón. En este sentido, el antagonista de glucagón descrito en el presente documento puede, por ejemplo, consistir esencialmente o consistir en los aminoácidos 1-27, 1-28, 2-27, 2-28, 3-27, 3-28, 4-27, 4-28, 5-27, 5-28, 6-27 ó 6-28 del péptido de glucagón nativo (SEQ ID NO: 1) con una o más modificaciones que dan lugar a actividad antagonista de glucagón tal como se describe aquí.

[0092] Los antagonistas de glucagón descritos en el presente documento también comprenden sustituciones de aminoácidos en las posiciones que se sabe que no son críticas para la función del péptido de glucagón. En una realización, las sustituciones son sustituciones conservadoras de aminoácidos en uno, dos o tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22, 23 ó 24 de la SEQ ID NO: 39. En una realización, el antagonista de glucagón comprende un péptido derivado de la SEQ ID NO: 42, en el que el péptido de glucagón comprende una sustitución de aminoácido adicional relativa a la SEQ ID NO: 42 en una a tres posiciones de aminoácidos seleccionadas de las posiciones 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14. En una realización, las sustituciones en las posiciones 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14 de la SEQ ID NO: 42 son sustituciones conservadoras de aminoácidos. En una realización, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 ó 29 del péptido nativo, y más particularmente en la posición 21 y/o 24, están sustituidos por cisteína o lisina, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de cisteína o lisina sustituido.

[0093] En aquellas realizaciones en las que el antagonista de glucagón comprende una cadena de polietilenglicol, la cadena de polietileno puede estar en forma de una cadena lineal o puede estar ramificada. Según una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Daltons. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 2.000 Daltons. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 1.000 Daltons.

[0094] Según una realización, el antagonista de glucagón modificado comprende dos o más cadenas de polietileno unidas covalentemente al péptido, en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, y SEQ ID NO: 22, en el que dicho péptido comprende una cadena de polietilenglicol unida al aminoácido en las posiciones 11 y 19 y el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.

[0095] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en
R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Xaa-Ser-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 9),
R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Xaa-Ser-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 10),
R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Xaa-Ser-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr R₂ (SEQ ID NO: 11)

y

R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Xaa-Ser-Tyr-Leu-Asp-Ser Arg-Arg-Ala-Gln-Phe-Val-Xaa-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 12),

5 en las que Xaa en la posición 4 = ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico, Xaa en la posición 7 = Lys o Arg, Xaa en la posición 10 es ácido aspártico, ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico; Xaa en la posición 11 es Ser, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina, Xaa en la posición 16 es Asp, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina y Xaa en la posición 19 es Gln, Lys, Cys, Orn, homocisteína y acetil fenilalanina, Xaa en la posición 22 = Met, Leu o Nle, R₁ es OH o NH₂, y R₂ es COOH o CONH₂, en el que el péptido está pegilado en la posición 11 para la SEQ ID NO: 9, en la posición 16 para la SEQ ID NO: 10, la posición 19 para la SEQ ID NO: 11 y en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 12, con la condición de que cuando Xaa en la posición 4 = ácido aspártico, entonces R₁ es OH. Según una realización, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, en las que R₁ es OH y R₂ es CONH₂. En una realización, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 11, en las que R₁ es OH, R₂ es CONH₂ y el aminoácido en la posición 4 es ácido aspártico, y en una realización adicional dichos péptidos comprenden una extensión carboxi terminal que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19.

[0096] Según una realización, el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, y SEQ ID NO: 16, en el que el péptido pegilado está en la posición 11 para las SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 13, está pegilado en la posición 16 para la SEQ ID NO: 10, y está pegilado en la posición 19 para las SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 14. En una realización, el agonista de glucagón comprende el péptido de las SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14. En una realización, el aminoácido C-terminal de los antagonistas de glucagón descritos en el presente documento tiene un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo. Según una realización, el antagonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 18.

25 [0097] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón en el que una proteína plasmática se ha unido covalentemente a una cadena lateral de aminoácido del péptido para mejorar la solubilidad, la estabilidad y/o la farmacocinética del péptido de glucagón. Por ejemplo, la albúmina de suero puede unirse covalentemente a los antagonistas de glucagón presentados en el presente documento. En una realización, la proteína plasmática se une covalentemente a un aminoácido correspondiente a la posición 16, 17, 20, 21, 24 ó 29 del péptido de glucagón nativo. Más particularmente, en una realización, la proteína plasmática se une a un aminoácido correspondiente a la posición 16 ó 24 del péptido de glucagón nativo, en el que el antagonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 39. En una realización, el antagonista de glucagón comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12.

[0098] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón en el que una secuencia de aminoácidos lineal que representa la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina se ha unido covalentemente a una cadena lateral de aminoácido de un antagonista de glucagón descrito en el presente documento para mejorar la solubilidad, la estabilidad y/o farmacocinética del péptido de glucagón. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que representa la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina puede unirse covalentemente a la posición 11, 12, 15, 16, 19, 21 ó 24 del péptido de glucagón de las SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 39, o un análogo de glucagón de las mismas. En una realización, el péptido Fc se une covalentemente a la posición 11 ó 19 del antagonista del glucagón de las SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 36. La parte Fc normalmente se aísla de IgG, pero el fragmento del péptido Fc de cualquier inmunoglobulina debe funcionar de forma equivalente. En una realización, el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 39, en las que la parte Fc se une a la posición correspondiente de 16, 17, 20, 21, 24 ó 29 del péptido de glucagón nativo. En una realización, el análogo de glucagón comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, en las que el péptido Fc se une a la cadena lateral del aminoácido situado en la posición 11, 16 ó 19 de las SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, respectivamente, y en ambas posiciones 11 y 19 para la SEQ ID NO: 12.

[0099] La presente descripción también abarca otros conjugados en los que los péptidos de glucagón de la invención están unidos, opcionalmente a través de un enlace covalente y opcionalmente a través de un enlazador, a un conjugado. La unión se puede realizar mediante enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas, tales interacciones electrostáticas, enlace de hidrógeno, fuerzas iónicas, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrofóbicas o hidrófilas. Se puede utilizar una variedad de sistemas de acoplamiento no covalentes, incluyendo biotina-avidina, ligando/receptor, enzima/sustrato, proteína unión a ácido nucleico/ácido nucleico, lípido/proteína de unión a lípido, compañeros de moléculas de adhesión celular; o cualquier compañero o fragmento de unión de los mismos que tienen afinidad entre sí.

[0100] Los conjugados de ejemplo incluyen, pero sin limitación, un péptido o polipéptido heterólogo (incluyendo, por ejemplo, una proteína plasmática), un agente de reconocimiento, una inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o región Fc), un marcador de diagnóstico, tal como un radioisótopo, fluoróforo o marcador enzimático, un polímero que incluye polímeros solubles en agua, u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En una realización, se proporciona un conjugado que comprende un péptido de glucagón de la presente invención y una

proteína plasmática, en el que la proteína plasmática se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas. En una realización, el grupo de proteína plasmática del conjugado es albúmina o transferrina. En algunas realizaciones, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o de 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, de 2 a 10 átomos, de 5 a 10 átomos, o de 10 a 20 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena en la cadena principal del enlazador se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N, y S. Los átomos de la cadena y los enlazadores se pueden seleccionar según su solubilidad esperada (hidrofilia) a fin de proporcionar un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que está sujeto a la escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas que se encuentran en el tejido u órgano o célula dianas. En algunas realizaciones, la longitud del enlazador es lo suficientemente larga para reducir el potencial del impedimento estérico. Si el enlazador es un enlace covalente o un enlace peptídico y el conjugado es un polipéptido, todo el conjugado puede ser una proteína de fusión. Dichos enlazadores peptídicos pueden ser de cualquier longitud. Los enlazadores de ejemplo son de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, de 5 a 50, de 3 a 5, de 5 a 10, de 5 a 15, o de 10 a 30 aminoácidos de longitud. Dichas proteínas de fusión se pueden producir, alternativamente, mediante métodos de ingeniería genética recombinante conocidos por un experto en la materia.

[0101] La secuencia Asp-Ser en la posición 15-16 del glucagón nativo ha sido identificado como un dipéptido únicamente inestable que conduce a la escisión química prematura de la hormona nativa en tampones acuosos. Por ejemplo, cuando se mantiene a HCl 0,01 N a 37°C durante 2 semanas, más de 50% del glucagón nativo se puede escindir en fragmentos. Los dos péptidos de escisión liberados 1-15 y 16-29 carecen de actividad biológica similar al glucagón y por lo tanto representan una limitación en la pre-formulación acuosa de glucagón y sus análogos relacionados. Se ha observado que la sustitución química selectiva de Asp en la posición 15 del péptido de glucagón nativo por Glu elimina prácticamente la escisión química del enlace peptídico 15-16.

[0102] Por consiguiente, se espera que los antagonistas de glucagón de la presente invención puedan modificarse de manera similar para disminuir su susceptibilidad a la escisión química prematura en tampones acuosos. Según una realización, los antagonistas de glucagón descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para mejorar su estabilidad en soluciones acuosas mediante la sustitución del aminoácido aspártico nativo, que se encuentra en la posición 15 del péptido de glucagón nativo, por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico. Según una realización, el residuo de ácido aspártico en la posición 10 del antagonista del glucagón de la SEQ ID NO: 39 se puede sustituir por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, y en una realización, el ácido aspártico nativo en la posición 10 de la SEQ ID NO: 39 se sustituye por ácido glutámico. Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que tiene una estabilidad mejorada en soluciones acuosas en la que el antagonista comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 42. En una realización adicional, se amida el antagonista de glucagón.

[0103] Según una realización, el aumento de la estabilidad mediante la reducción de la degradación del antagonista de glucagón descrito en el presente documento también puede lograrse mediante la sustitución de la serina en la posición 16 (según la numeración del glucagón nativo) por ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico. En una realización específica, la serina en la posición 16 (según la numeración de la secuencia del glucagón nativo) se sustituye por ácido glutámico. En un aspecto más específico, el antagonista del glucagón que comprende dicha modificación comprende un carboxilato C-terminal y no está amidado.

[0104] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, modificado adicionalmente mediante una o más sustituciones adicionales de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones 11, 12, 15, 16, 19 y/o 24 del péptido de glucagón nativo, en el que las sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución por un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con grupos hidrófilos, incluyendo, por ejemplo, PEG. El péptido de glucagón nativo puede estar sustituido con un aminoácido natural o sintético (de origen no natural). Los aminoácidos sintéticos o no naturales se refieren a aminoácidos que no son naturales in vivo pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas en el presente documento. En una realización se proporciona un antagonista de glucagón en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, y comprende además una cadena de polietileno unida a la posición correspondiente 21 ó 24 del péptido de glucagón nativo. En una realización adicional, el C-terminal del péptido de glucagón se modifica para sustituir el grupo ácido carboxílico por un grupo amida.

[0105] Los solicitantes también han descubierto que el glucagón nativo puede modificarse mediante la introducción de la carga en su extremo carboxilo para mejorar la solubilidad del péptido, manteniendo las propiedades agonistas del péptido. La solubilidad mejorada permite para la preparación y almacenamiento de soluciones de glucagón a pH casi neutro. La formulación de soluciones de glucagón a valores de pH relativamente neutros (por ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0) mejora la estabilidad a largo plazo de los péptidos de glucagón.

[0106] Una vez más, los solicitantes prevén que los antagonistas de glucagón descritos en este documento pueden modificarse de manera similar para mejorar su solubilidad en soluciones acuosas a pH relativamente neutro (por

ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0), manteniendo las propiedades antagonistas de la proteína original. Por consiguiente, una realización de la presente invención se refiere a un antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 39 que se ha modificado adicionalmente con respecto a los aminoácidos nativos presentes en las posiciones 6-29 del glucagón de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) para añadir carga al péptido mediante la sustitución de los aminoácidos no cargados nativos por aminoácidos cargados, o la adición de aminoácidos cargados al extremo carboxilo. Según una realización, se sustituyen de uno a tres de los aminoácidos nativos no cargados del antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 39 por un aminoácido cargado. En una realización, se selecciona el aminoácido cargado del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico. Más particularmente, los solicitantes han descubierto que sustituyendo el aminoácido normal en la posición 28 y/o 29 correspondientes con respecto al glucagón nativo por aminoácidos cargados y/o la adición de uno a dos aminoácidos cargados en el extremo carboxilo del péptido de glucagón, se mejora la solubilidad y la estabilidad de los péptidos de glucagón en soluciones acuosas a pH fisiológicamente relevantes (es decir, un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5). Por consiguiente, se prevé que dichas modificaciones del antagonista de glucagón descrito en el presente documento tenga un efecto similar sobre la solubilidad en soluciones acuosas, particularmente a un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, manteniendo la actividad biológica del péptido original.

[0107] Según una realización, el antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 39 se modifica mediante la sustitución del aminoácido nativo en la posición 28 y/o 29 correspondiente con respecto al glucagón nativo por un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) y opcionalmente la adición de un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) en el extremo carboxilo del péptido. En una realización alternativa, el péptido de glucagón nativo de la SEQ ID NO: 39 se modifica mediante la sustitución del aminoácido nativo en la posición 29 correspondiente con respecto al glucagón nativo por un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) y opcionalmente la adición de uno o dos aminoácidos cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en el extremo carboxilo del péptido. Según una realización, se proporciona un análogo de glucagón que tiene una solubilidad y estabilidad mejoradas, en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 con la condición de que al menos un aminoácido en la posición, 23, ó 24 de la SEQ ID NO: 41 esté sustituido por un aminoácido ácido, y/o se añada un aminoácido ácido adicional en el extremo carboxilo de la SEQ ID NO: 41. En una realización, los aminoácidos ácidos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico.

[0108] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que tiene una solubilidad y estabilidad mejoradas, en el que el antagonista comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 o SEQ ID NO: 44, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 23 ó 24 está sustituido por un residuo de aminoácido no nativo (es decir, al menos un aminoácido presente en la posición 23 ó 24 del análogo es un aminoácido ácido diferente del aminoácido presente en la posición correspondiente en la SEQ ID NO: 7). Según una realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 41 ó 42 con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 23 es asparagina y el aminoácido en la posición 24 es treonina, el péptido comprende además uno a dos aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu, añadido al extremo carboxilo del antagonista de glucagón.

[0109] La presente descripción también abarca péptidos de fusión con antagonistas de glucagón, en los que un segundo péptido se ha fusionado con el extremo C-terminal del antagonista de glucagón. Más particularmente, el péptido de fusión puede comprender un péptido antagonista de glucagón de SEQ ID NO: 44 que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 20 (Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala) o SEQ ID NO: 21 (Lys Arg Asn Arg) unida al aminoácido C-terminal del antagonista de glucagón. En una realización, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) está unida al aminoácido 24 del antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 42 a través de un enlace peptídico. En otra realización, el péptido de fusión comprende un péptido antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido 24 de la antagonista de glucagón. En otra realización, el péptido de fusión comprende un péptido antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41 o SEQ ID NO: 43 que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 53 unida al aminoácido 24 del antagonista de glucagón. En una realización, el péptido de fusión con antagonista de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47. En una realización adicional, el extremo C-terminal del péptido de fusión se modifica para sustituir el grupo ácido carboxílico por un grupo amida.

[0110] En una realización, se proporciona un péptido de fusión con antagonista de glucagón en el que la parte del antagonista de glucagón del péptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 39 y la secuencia de SEQ ID NO: 19 se fusiona al extremo carboxi terminal de la parte de antagonista de glucagón, y en el que la cadena de PEG, cuando está presente, se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. Más particularmente, en una realización, se selecciona el segmento de antagonista de glucagón del grupo que consiste en SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47, en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Daltons, y más

particularmente, en una realización, la cadena de PEG es de aproximadamente 1.000 Daltons. En una realización adicional, el extremo C-terminal se modifica para sustituir el grupo ácido carboxílico por un grupo amida.

[0111] El antagonista de glucagón puede comprender además de uno a dos aminoácidos cargados añadidos al extremo carboxilo. En una realización, en la que se añaden de uno a dos aminoácidos cargados al extremo carboxilo de la SEQ ID NO: 44, los aminoácidos son aminoácidos cargados negativamente, incluyendo, por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico. En una realización, el antagonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 42, en el que al menos una de las posiciones 27 y 28 correspondientes con respecto al péptido de glucagón nativo comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico y en el que la SEQ ID NO: 42 está opcionalmente modificada para incluir la adición de uno a dos aminoácidos cargados negativamente añadidos al extremo carboxilo. En una realización, los aminoácidos cargados negativamente son el ácido glutámico o ácido aspártico.

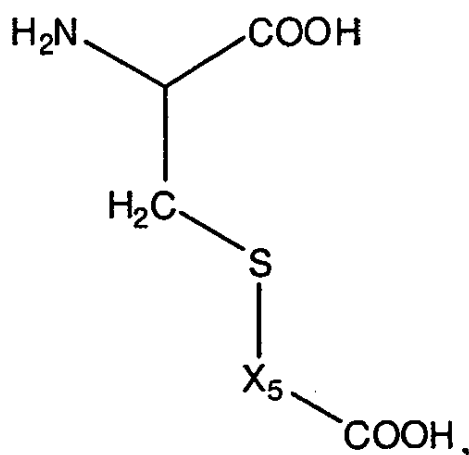
[0112] En otra realización, la solubilidad del antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 42 se puede mejorar mediante la unión covalente de un grupo hidrófilo a un residuo de aminoácido en la posición 11, 12, 15, 16, 19 ó 24, y, en una realización, el grupo hidrófilo se une a un aminoácido en la posición 11, 16 ó 19, y, en una realización adicional, el grupo hidrófilo se une al aminoácido 19. En una realización, el grupo hidrófilo es una proteína plasmática o la parte Fc de una inmunoglobulina, y, en una realización alternativa, el grupo hidrófilo es una cadena hidrocarbonada hidrófila. En una realización, el grupo hidrófilo es polietilenglicol, que tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En otra realización, el grupo hidrófilo es polietilenglicol, que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20.000 Daltons. En una realización, el antagonista de glucagón modificado con polietileno comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 o SEQ ID NO: 45.

[0113] En una realización, el antagonista de glucagón comprende la estructura general de A-B-C, en la que A se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) ácido fenil láctico (PLA);
- (ii) un derivado oxi de PLA;
- (iii) un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter;

B representa los aminoácidos i a 26 de la SEQ ID NO: 1, en el que i es 3, 4, 5, 6, ó 7, que comprende opcionalmente una o más modificaciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en:

- (iv) Asp en la posición 9 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) está sustituido por Glu, un derivado de ácido sulfónico de Cys, ácido homoglutámico, ácido β -homoglutámico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄.

- (v) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) por un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida, o alquilamina;

- (vi) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetil-fenilalanina (Ac-Phe), en la que el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un grupo hidrófilo;

- (vii) Asp en la posición 15 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) está sustituido por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

- (viii) Ser en la posición 16 (según la numeración de SEQ ID NO: 1) está sustituido por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(ix) sustitución por AIB en una o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1; y

C se selecciona del grupo que consiste en:

(x) X;

(xi) X-Y;

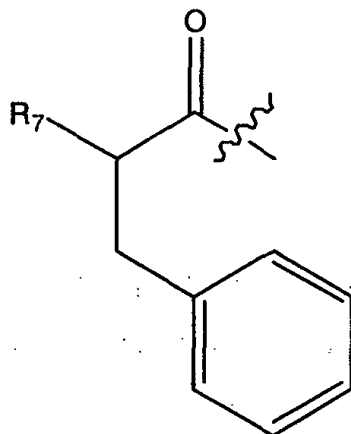
(xii) X-Y-Z; y

(xiii) X-Y-Z-R10,

en el que X es Met, Leu, o Nle; Y es Asn o un aminoácido cargado; Z es Thr, Gly, Cys, Lys, ornitina (Orn), homocisteína, acetil fenilalanina (Ac-Phe), o un aminoácido cargado; en el que R10 se selecciona de un grupo que consiste en SEQ ID NO: 19-21 y 53; y

(xiv) cualquiera de (x) a (xiii) en que el carboxilato C-terminal está sustituido por una amida.

[0114] En un aspecto específico, el antagonista de glucagón comprende un derivado oxi de PLA, por ejemplo, un éster de PLA o un éter de PLA. En una realización, el éster de PLA comprende la estructura de fórmula IV:



Fórmula IV

en la que R7 es un éster formado tras la reacción del hidroxilo de PLA con un carbonilo que lleva un nucleófilo.

[0115] En una realización específica, el derivado oxi de PLA comprende un grupo químico seleccionado del grupo que consiste en un polímero (por ejemplo, un polialquilenglicol), un carbohidrato, un aminoácido, un péptido, y un lípido, por ejemplo, un ácido graso o un esteroide, en el que el grupo químico está unido a PLA través de un enlace que contiene oxígeno (por ejemplo, un enlace éster o éter).

[0116] En una realización específica, el grupo químico es un aminoácido, que, opcionalmente, es una parte de un péptido, de manera que la fórmula IV es un depsipéptido. En este sentido, PLA puede estar en una posición distinta al residuo de aminoácido N-terminal del antagonista de glucagón, de manera que el antagonista de glucagón comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) aminoácidos N-terminales al residuo PLA. Por ejemplo, el antagonista de glucagón puede comprender PLA en la posición n, en el que n es 2, 3, 4, 5, o 6 del antagonista de glucagón.

[0117] Los aminoácidos N-terminales al residuo PLA pueden ser sintéticos o naturales. En una realización específica, los aminoácidos que son N-terminales a PLA son aminoácidos naturales. En una realización, los aminoácidos que son N-terminales a PLA son los aminoácidos N-terminales de glucagón nativo. Por ejemplo, el antagonista del glucagón puede comprender en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 54-58, en las que PLA está unido a treonina mediante un enlace éster:

SEQ ID NO: 54 Su-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 55 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 56 Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 57 Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 58 Thr-PLA

[0118] En una realización alternativa, uno o más de los aminoácidos N-terminales pueden sustituirse por un aminoácido distinto del aminoácido de glucagón nativo. Por ejemplo, cuando el antagonista de glucagón comprende PLA como aminoácido en la posición 5 ó 6, el aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 1 del antagonista de glucagón es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, ácido alfa, alfa dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil-histidina, ácido imidazolacético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metilsarina, N-metilalanina y ácido aminoisobutírico (AIB). También, por ejemplo, cuando el antagonista de glucagón comprende

PLA como aminoácido en la posición 4, 5, ó 6, el aminoácido en la posición 3 del antagonista de glucagón puede ser ácido glutámico, en oposición al residuo de glutamina nativo del glucagón nativo. En una realización de ejemplo de la invención, el antagonista de glucagón comprende en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOS: 59-61.

[0119] Con respecto a los antagonistas de glucagón que comprenden un compuesto de Fórmula IV, el polímero puede ser cualquier polímero, siempre que pueda reaccionar con el grupo hidroxilo de PLA. El polímero puede ser aquel que, de forma natural o normal, comprende un carbonilo con nucleófilo, por ejemplo. Alternativamente, el polímero puede ser aquel que se haya derivado para comprender el carbonilo que lleva un nucleófilo. El polímero puede ser un polímero derivado de cualquiera de: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos, incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros vinílicos, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo), y polivinilpirrolidona, poliglicólicos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo alquilcelulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, y sal sódica de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno) y poli (tereftalato de etileno), y poliestireno.

[0120] El polímero puede ser un polímero biodegradable, incluyendo un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli (ácido valérico), y poli(láctido-cocaprolactona)), y un polímero natural biodegradable (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos, incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileo, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones realizadas rutinariamente por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrófilas (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan mediante hidrólisis enzimática o la exposición al agua in vivo, por erosión superficial o general.

[0121] El polímero puede ser un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por H.S. Sawhney, C. P. Pathak y J.A. Hubbell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

[0122] En una realización, el polímero es un polímero soluble en agua. Los polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, hidroxipropil etilcelulosa, hidroxipropil butilcelulosa, hidroxipropil pentalcelulosa, metil celulosa, etil celulosa (Ethocel), hidroxietil celulosa, diversas alquil celulosas e hidroxialquil celulosas, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, copolímeros de acetato de vinilo/ácido crotónico, metacrilato de poli-hidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido metacrílico, polimetacrilato de metilo, copolímeros de anhídrido maleico/metil vinil éter, poli vinilalcohol, ácido poliacrílico sódico y cálcico, ácido poliacrílico, carboxi polímeros ácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxitileno y polioxiisopropileno, anhídrido de polimetilviniléter co-maleico, carboximetilamida, co-polímero de metacrilato de potasio y divinilbenceno, polioxitilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

[0123] En una realización específica, el polímero es un polialquilenglicol, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

[0124] El hidrato de carbono puede ser cualquier hidrato de carbono siempre que comprenda o esté producido para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. El hidrato de carbono, por ejemplo, puede ser aquel que haya sido derivatizado para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. En este sentido, el hidrato de carbono puede ser una forma derivatizada de un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano).

[0125] Con respecto a los antagonistas de glucagón que comprenden un compuesto de fórmula IV, el lípido puede ser cualquier lípido que comprenda un carbonilo con un grupo saliente alfa. El lípido, por ejemplo, puede ser aquel que se derivatiza para comprender el carbonilo. En este sentido, el lípido, puede ser un derivado de un ácido graso (por ejemplo, un ácido graso C4-C30, eicosanoide, prostaglandina, leucotrienos, tromboxano, N-acil etanolamina), glicerolípido (por ejemplo, mono, glicerole mono-, di-, trisustituidos), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípidos (por ejemplo, esfingosina, ceramida), lípido esteroide

(por ejemplo, esteroide, colesterol), lípido prenol, sacarolípido, o un policétido, aceite, cera, colesterol, esterol, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

[0126] En una realización, R7 tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa o menos. En consecuencia, R7 tiene un peso molecular de aproximadamente 35 kDa o menos, aproximadamente 30 kDa o menos, aproximadamente 25 kDa o menos, aproximadamente 20 kDa o menos, aproximadamente 15 kDa o menos, aproximadamente 10 kDa o menos, aproximadamente 5 kDa o menos, o aproximadamente 1 kDa.

[0127] En una realización alternativa, el antagonista de glucagón comprende como A, un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter. El péptido puede comprender cualquiera de los aminoácidos, sintéticos o naturales, siempre que al menos dos aminoácidos consecutivos del péptido estén unidos a través de un enlace éster o éter. En una realización específica, el péptido comprende los aminoácidos del glucagón nativo. Por ejemplo, el péptido puede comprender j a 6 de glucagón nativo (SEQ ID NO: 1), en la que j es 1, 2, 3, 4, ó 5. Alternativamente, el péptido puede comprender una secuencia de aminoácidos basada en el extremo N-terminal de la SEQ ID NO: 1 con una o más modificaciones de aminoácidos. El aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Por ejemplo, el péptido puede comprender en la posición 1 del antagonista de glucagón un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, ácido alfa,alfa dimetil imidiazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil-histidina, ácido imidazolacético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metilserina, N-metilalanina y ácido aminoisobutírico (AIB). También, por ejemplo, el aminoácido en la posición 3 del antagonista de glucagón puede ser ácido glutámico, en oposición al residuo de glutamina nativo del glucagón nativo. Por consiguiente, el antagonista de glucagón puede comprender una secuencia de aminoácidos de:

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 68);
Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 69); o
Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 70);

en la que Xaa₁ se selecciona de un grupo que consiste en: His, D-histidina, ácido alfa, alfa-dimetil imidiazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil-histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hidroxil histidina, acetil histidina y homo histidina; Xaa₂ se selecciona de un grupo que consiste en: Ser, D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina, N-metil alanina y ácido aminoisobutírico (AIB); y Xaa₃ es Gln o Glu.

[0128] Con respecto al antagonista de glucagón que comprende la estructura general A-B-C, B representa aminoácidos de glucagón nativo, por ejemplo, i a 26 de la SEQ ID NO: 1, en la que i es 3, 4, 5, 6, ó 7, que comprende opcionalmente una o más modificaciones de aminoácidos. En una realización específica, B representa los aminoácidos 7 a 26 de la SEQ ID NO: 1, opcionalmente modificada adicionalmente.

[0129] En una realización, B se modifica mediante hasta tres modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, B, que representa la secuencia de aminoácidos nativa de la SEQ ID NO: 1 se modifica por una o más modificaciones de aminoácidos conservadoras.

[0130] En otra realización, B comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en (iv) a (ix), tal como se describe aquí. En una realización específica, B comprende una o ambas de las modificaciones de aminoácidos (v) y (vi). En una realización específica adicional, B comprende uno o una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en (iv), (vii), (viii) y (ix), además de (v) y (vi).

[0131] En otra realización específica, el antagonista de glucagón comprende uno o más aminoácidos cargados en el extremo C-terminal. Por ejemplo, Y y/o Z pueden ser un aminoácido cargado, por ejemplo, Lys, Arg, His, Asp, y Glu. En aún otra realización, el antagonista de glucagón comprende de uno a dos aminoácidos cargados (por ejemplo, Lys, Arg, His, Asp, y Glu) C-terminal a la Z. En un aspecto específico, Z seguido por uno a dos aminoácidos cargados hace no comprender R10.

[0132] El antagonista de glucagón en una realización comprende un grupo hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido del antagonista de glucagón, tal como se describe aquí. Por ejemplo, el antagonista del glucagón puede comprender un grupo hidrófilo unido covalentemente a un aminoácido en la posición 1, 16, 20, 21, ó 24, según la numeración de SEQ ID NO: 1. En otra realización, el grupo hidrófilo se une al aminoácido C-terminal del antagonista de glucagón, que en algunos casos, está 1 u 11 aminoácidos C-terminales a Z. En otra realización, el grupo hidrófilo se une a PLA, cuando A es PLA, PLA-Phe, o PLA-Thr-Phe, en el que PLA se modifica para comprender el grupo hidrófilo. En otra realización, se añade un aminoácido que comprende un grupo hidrófilo al extremo N o C-terminal del antagonista de glucagón.

[0133] En otra realización, el antagonista de glucagón comprende un grupo acilo o un grupo alquilo, tal como se describe aquí. Por ejemplo, la acilación o alquilación puede tener lugar fuera de la cadena lateral del aminoácido en la posición 10, 20, ó 24, según la numeración de SEQ ID NO: 1. En una realización alternativa, la acilación o la alquilación

tiene lugar fuera de la cadena lateral del aminoácido C-terminal del antagonista de glucagón, que en algunos casos, está 1 u 11 aminoácidos C-terminales a Z. En otra realización, cuando A es PLA, PLA-Phe, o PLA-Thr Phe, el PLA se modifica para comprender un grupo acilo o alquilo.

5 **[0134]** En ciertas realizaciones de la invención, el antagonista de glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 62, 64-67, y 71.

10 **[0135]** Se cree que los antagonistas de glucagón descritos son adecuados para cualquier uso que anteriormente se haya descrito para otros antagonistas de glucagón. Por consiguiente, los péptidos de glucagón modificados descritos en este documento se pueden utilizar para tratar la hiperglucemia, o para tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles elevados en sangre de glucagón o niveles elevados en sangre de glucosa. Según una realización, el paciente a tratar con los antagonistas de glucagón descritos en este documento es un animal domesticado, y en otra realización, el paciente a tratar es un humano. Los estudios sugieren que la falta de supresión de glucagón en pacientes diabéticos contribuye a la hiperglucemia postprandial, en parte, a través de glucogenolisis acelerada. El análisis de glucosa en sangre durante una prueba de tolerancia a la glucosa oral (OGTT), y en presencia o ausencia de supresión de glucagón inducida por somatostatina, ha mostrado un aumento significativo en la glucosa en sujetos con mayores niveles de glucagón. Por consiguiente, el antagonista de glucagón de la presente invención se puede utilizar para tratar la hiperglucemia, y se espera que sean útiles para tratar una variedad de tipos de diabetes, incluyendo diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, o diabetes gestacional, ya sea dependiente de insulina o no dependiente de insulina y reducir complicaciones de la diabetes, incluyendo nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

25 **[0136]** La exendina-4, es un péptido compuesto por 39 aminoácidos. Es un potente estimulador de un receptor conocido como GLP-1. También se ha descrito que este péptido suprime el apetito e induce la pérdida de peso. Los solicitantes han encontrado que la secuencia terminal de la exendina-4 cuando se añade en el extremo carboxilo de glucagón mejora la solubilidad y la estabilidad del glucagón sin comprometer la bioactividad del glucagón. Según una realización, el antagonista de glucagón descrito en este documento se administra a los pacientes como un método para reducir el apetito o promover la pérdida de peso corporal. Según una realización, el paciente es un animal domesticado, y en otra realización, el paciente a tratar es un humano. En una realización, los diez aminoácidos terminales de exendina-4 (es decir, la secuencia de SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS)) están unidos al extremo carboxilo de un antagonista de glucagón descrito en este documento. Se prevé que estas proteínas de fusión tienen actividad farmacológica para suprimir el apetito e inducir la pérdida de peso/mantenimiento de peso. Según una realización, los antagonistas de glucagón descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido 24 del antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 42 y administrarse a individuos para inducir la pérdida de peso o ayudar en el mantenimiento del peso. Más particularmente, el péptido de glucagón que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 y que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido 24 del antagonista de glucagón se utiliza para suprimir el apetito e inducir la pérdida de peso/mantenimiento del peso. En una realización, el antagonista de glucagón administrado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 46 o SEQ ID NO: 47.

45 **[0137]** Se espera que dichos métodos para reducir el apetito o promover la pérdida de peso corporal sean útiles en la reducción de peso corporal, la prevención de la ganancia de peso, el tratamiento de la obesidad de varias causas, incluyendo la obesidad inducida por fármacos, y la reducción de complicaciones asociadas con la obesidad, incluyendo la enfermedad vascular (enfermedad de la arteria coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, reperfusión de isquemia, etc), la hipertensión, la aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas.

50 **[0138]** Los péptidos de glucagón de la invención se pueden administrar solos o en combinación con otros agentes anti-diabéticos o anti-obesidad. Los agentes anti-diabéticos conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen la insulina, las sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirida (Amaryl), o gliclazida (Diamicron); meglitinidas, tales como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas, tales como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidinedionas, tales como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos), o troglitazona (Rezulin), u otros inhibidores de PPAR γ ; inhibidores de la alfa glucosidasa que inhiben la digestión de hidratos de carbono, tales como miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/Glucobay); exenatida (Byetta) o pramlintida; inhibidores de dipeptidil Peptidasa-4 (DPP-4), tales como vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador de glucosa dependiente de sodio 1); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

60 **[0139]** Los agentes antiobesidad conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen supresores del apetito, incluyendo estimulantes de tipo fenetilamina, fentermina (opcionalmente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropión (Tenuate®), fendimetrazina (Prelu-2®, Bontril®), benzfetamina (Didrex®), sibutramina (Meridia®, Reductil®); rimonabant (Acomplia®), otros antagonistas de los receptores de cannabinoides; oxintomodulina; clorhidrato de fluoxetina (Prozac); Qnexa (topiramato y fentermina), Excalia (bupropión y zonisamida) o Contrave (bupropión y naltrexona); o inhibidores de lipasa, similar a Xenical (Orlistat) o Cetilistat (también conocido como ATL-962), o GT 389-255.

[0140] Los antagonistas de glucagón de la presente invención también se pueden administrar a pacientes que sufren de desgaste catabólico. Se estima que más de la mitad de los pacientes con cáncer experimentan desgaste catabólico que se caracteriza por la pérdida no intencionada y progresiva de peso, debilidad, y poca grasa y músculo corporal. El síndrome es igualmente común en pacientes con SIDA y también puede estar presente en enfermedades bacterianas y parasitarias, artritis reumatoide, y enfermedades crónicas del intestino, hígado, pulmones y corazón. Por lo general se asocia con la anorexia y se puede manifestarse como una afección en el envejecimiento o como resultado de un trauma físico. El desgaste catabólico es un síntoma que disminuye la calidad de vida, empeora la afección subyacente, y es una causa importante de muerte. Los solicitantes prevén que los antagonistas de glucagón descritos en este documento pueden administrarse a los pacientes para tratar el desgaste catabólico.

[0141] Las composiciones farmacéuticas que comprenden los antagonistas de glucagón descritos en este documento se pueden formular y administrar a los pacientes utilizando portadores farmacéuticamente aceptables estándar y vías de administración conocidas por los expertos en la materia. Por consiguiente, la presente descripción también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los antagonistas de glucagón descritos en este documento en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los antagonistas de glucagón como el único componente farmacéuticamente activo, o los antagonistas de glucagón pueden combinarse con uno o más agentes activos adicionales. Según una realización, se proporciona una composición que comprende un antagonista de glucagón de la presente invención y un compuesto que activa el receptor de GLP-1 (tal como GLP-1, un análogo de GLP-1, un análogo de exendina-4, o sus derivados). Según una realización, se proporciona una composición que comprende un antagonista de glucagón de la presente invención y la insulina o un análogo de insulina. Alternativamente, se puede proporcionar una composición proporcionada para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 42 que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido 24 de SEQ ID NO: 42, y un péptido anti-obesidad. Los péptidos anti-obesidad adecuados incluyen los descritos en las patentes US 5.691.309, 6.436.435 o la solicitud de patente de EE.UU. 20050176643, y que incluyen, pero sin limitación, GLP-1, GIP (polipéptido inhibidor gástrico), MP1, PYY, MC-4, leptina.

[0142] Según una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los nuevos péptidos de glucagón descritos en este documento, preferiblemente estéril y preferiblemente a un nivel de pureza de al menos el 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96 %, 97%, 98% ó 99%, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden contener un péptido de glucagón a una concentración de al menos 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml o superior. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones acuosas que se esterilizan y opcionalmente almacenan en varios recipientes. Los compuestos de la presente invención se pueden utilizar según una realización para preparar soluciones preformuladas listas para la inyección. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un polvo liofilizado. Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse adicionalmente como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para la administración de la composición a un paciente. Los recipientes o kits pueden etiquetarse para el almacenamiento a temperatura ambiente o a temperatura refrigerada.

[0143] Todos los métodos terapéuticos, composiciones farmacéuticas, kits y otras realizaciones similares descritas en el presente documento contemplan que el uso del término antagonista de glucagón incluye todas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0144] La PEGilación de antagonistas de glucagón puede mejorar la solubilidad acuosa de los antagonistas. Sin embargo, aumentar la longitud de la cadena de PEG, o unir múltiples cadenas de PEG al péptido, de manera que el peso molecular total del PEG unido es mayor que 5.000 Daltons, comienza a retrasar la acción del antagonista de glucagón modificado. Según una realización, se proporciona un antagonista 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 que 5.000 Daltons, y en una realización es mayor que 10.000 Daltons. Dichos antagonistas de glucagón modificados tienen un tiempo de retraso de la actividad pero sin pérdida de bioactividad. Por consiguiente, dichos compuestos se pueden administrar profilácticamente para extender el efecto del antagonista de glucagón administrado.

[0145] En una realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45, en el que la cadena lateral de un residuo de aminoácido en la posición 11, 16 ó 19 del péptido está unido covalentemente a una o más cadenas de polietilenglicol, en el que el peso molecular total de la cadena o cadenas de PEG es superior a aproximadamente 10.000 Daltons. En una realización, el peso molecular de la cadena o cadenas de PEG es superior a 10.000 e inferior o igual a 40.000 Daltons. En una realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 43, en el que un residuo de aminoácido en la posición 11 del péptido está unido covalentemente a una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Daltons. En una realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 44, en el que un residuo de aminoácido en la posición 16 del péptido está unido covalentemente a una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular

seleccionado del intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Daltons. En una realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 45, en el que un residuo de aminoácido en la posición 19 del péptido está unido covalentemente a una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Daltons. En otra realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 16, en el que la cadena de PEG unida covalentemente tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 10.000 Daltons, y en una realización el peso molecular del PEG se selecciona del intervalo de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 daltons. En otra realización, el antagonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 22, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo aminoácido en la posición 11 y en la posición 19, en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es al menos de aproximadamente 10.000 Daltons.

[0146] Los antagonistas de glucagón descritos en este documento se pueden combinar con otros agentes activos, incluyendo, por ejemplo, insulina, para tratar enfermedades o afecciones que se caracterizan por la actividad excesiva de glucagón. En una realización, los antagonistas de glucagón que han sido modificados para unirse covalentemente a una cadena de PEG que tiene un peso molecular de más de 10.000 Daltons se puede administrar en combinación con la insulina para ayudar a mantener estables los niveles de glucosa en sangre en los diabéticos. Los antagonistas de glucagón de la presente descripción se pueden administrar conjuntamente con la insulina como una composición única, se pueden administrar simultáneamente como soluciones separadas, o alternativamente, la insulina y el antagonista de glucagón se pueden administrar en momentos diferentes una respecto a la otra. En una realización, la composición que comprende la insulina y la composición que comprende el antagonista de glucagón se administran dentro de 12 horas una de la otra. La relación exacta del antagonista de glucagón con respecto a la insulina administrada dependerá, en parte, de la determinación de los niveles de glucagón del paciente, y puede determinarse mediante experimentación rutinaria.

[0147] La presente descripción también abarca multímeros de los antagonistas de glucagón modificados descritos en este documento. Dos o más de los péptidos de glucagón modificados pueden unirse entre sí usando agentes y procedimientos de unión estándar conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden formarse dímeros entre dos antagonistas de glucagón modificados mediante el uso de agentes de reticulación bifuncionales tiol y de amina, en particular para antagonistas de glucagón que han sido sustituidos (en las posiciones 11, 16 ó 19, por ejemplo) por residuos de cisteína, lisina, ornitina, homocisteína o acetil fenilalanina (por ejemplo, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12). El dímero puede ser un homodímero o, alternativamente, puede ser un heterodímero. En una realización, se forma el dímero entre dos antagonistas de glucagón seleccionados independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, o SEQ ID NO: 47, en el que los dos péptidos están unidos entre sí a través de un enlazador unido a la posición 11 de cada péptido, 16 de cada péptido, o la posición 19 de cada péptido o cualquier combinación de los mismos. En una realización, la unión es un enlace disulfuro entre un residuo Cys11 a Cys11 o una Cys19 a Cys19 o una Cys11 a Cys19 de los respectivos péptidos antagonistas de glucagón.

[0148] Del mismo modo, puede formarse un dímero entre dos péptidos antagonistas de glucagón seleccionados independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 42, en el que el enlace se forma entre las posiciones de aminoácido seleccionadas independientemente de las posiciones 16, 21 y 24 con respecto al péptido de glucagón nativo.

[0149] Según una realización, se proporciona un dímero de antagonistas de glucagón que comprende dos antagonistas de glucagón, que comprende cada uno la secuencia de SEQ ID NO: 46, en el que los dos antagonistas están unidos entre sí por un enlace disulfuro a través de la posición de aminoácido 25. En otra realización, se proporciona un dímero de antagonistas de glucagón que comprende dos antagonistas de glucagón, que comprende cada uno la secuencia de SEQ ID NO: 47, en el que los dos antagonistas están unidos entre sí por un enlace disulfuro a través de la posición de aminoácido 35. En una realización, el dímero se forma a partir de antagonistas de glucagón de la SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47 en los que el aminoácido en la posición 10 es ácido glutámico.

[0150] En una realización, el dímero comprende un homodímero de un péptido de fusión con antagonista de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42 y sales farmacéuticamente aceptables de dichos antagonistas de glucagón. Según una realización, se proporciona un dímero que comprende un primer antagonista de glucagón unido a un segundo antagonista de glucagón a través de un enlazador, en el que el primer y segundo péptido de glucagón del dímero se seleccionan independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, y SEQ ID NO: 42, y sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos de glucagón. En otra realización, el primero y segundo péptido de glucagón del dímero se seleccionan independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 39.

[0151] En otra realización, el dímero comprende un homodímero de un antagonista de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28,

SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31. En otra realización, se proporciona un dímero de antagonistas de glucagón en el que el primer y segundo péptido de glucagón del dímero comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. En otra realización, el dímero comprende un homodímero de un antagonista de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, en el que el péptido de glucagón comprende además una cadena de polietilenglicol unida covalentemente a la posición 11 ó 19 del péptido de glucagón.

[0152] Los péptidos de glucagón modificados de la presente invención pueden proporcionarse, según una realización, como parte de un kit. En una realización, se proporciona un kit para administrar un agonista de glucagón a un paciente con necesidad del mismo, en el que el kit comprende un antagonista de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en

1) un antagonista de glucagón que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44.

2) un antagonista de glucagón pegilado, en el que la cadena de PEG está unida covalentemente a la posición 11,12, 15, 16, 19, 24 ó 35 de un antagonista de glucagón que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47, en el que la cadena de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons;

3) un péptido de fusión que comprende un antagonista de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, y el péptido de SEQ ID NO: 19 fusionado con el aminoácido terminal de dicho antagonista de glucagón;

y
4) un antagonista de glucagón pegilado, que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 19 (GPSSGAPPPS) unida al extremo carboxilo del antagonista de glucagón, en el que la cadena de PEG unida covalentemente tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0153] En una realización, se proporciona el kit con un dispositivo para administrar la composición de antagonista de glucagón a un paciente. El kit puede incluir además una variedad de recipientes, por ejemplo, viales, tubos, botellas, y similares. Preferiblemente, los kits también incluirán instrucciones de uso. Según una realización, el dispositivo del kit es un dispositivo de dispensación en aerosol, en el que la composición está preenvasada en el dispositivo de aerosol. En otra realización el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización la composición de antagonista de glucagón está preenvasada dentro de la jeringa.

Incorporación de aminoácidos alfa, alfa disustituidos

[0154] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón que comprende (ya sea mediante sustitución o inserción de aminoácidos) uno o más aminoácidos α,α -disustituidos en la parte C-terminal del péptido de glucagón (aproximadamente los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos del glucagón tipo salvaje). En una realización específica, el aminoácido α,α -disustituido es uno de ácido aminoisobutírico (AIB), un aminoácido disustituido con el mismo o un grupo diferente seleccionado entre metilo, etilo, propilo, y n-butilo, o con un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 24 ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) están sustituidas por un aminoácido α,α -disustituido. En una realización específica, una, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) están sustituidas por AIB. En un aspecto específico, en el que el antagonista de glucagón comprende uno o más aminoácidos α,α -disustituidos, por ejemplo, AIB, el antagonista de glucagón comprende un carboxilato C-terminal y no está amidado en el extremo C-terminal.

Unión de grupos hidrófilos

[0155] En una realización, la solubilidad de los antagonistas de glucagón descritos en este documento se mejora mediante la unión covalente de un grupo hidrófilo al péptido. Los grupos hidrófilos se pueden unir a los antagonistas de glucagón bajo cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Se pueden usar cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo a través de acilación, alquilación reductora, adición de Michael, alquilación con tiol u otros métodos de conjugación/unión quimioselectiva a través de un grupo reactivo sobre el grupo PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino) a un grupo reactivo en el compuesto diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino). Los grupos activadores que pueden utilizarse para enlazar el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen, sin limitación sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirine, oxirano y 5-piridilo. Si se une al péptido antagonista mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un único aldehído reactivo, de manera que se controla el grado de polimerización. Véase, por ejemplo, Kinstler et al., Adv. Drugs. Delivery Rev. 54: 477-485 (2002); Roberts et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 459-476 (2002); y Zalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182 (1995).

[0156] Los grupos hidrófilos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioles polioxielados (por ejemplo, POG), sorbitol polioxielado, glucosa polioxielada, glicerol polioxielado (POG), polioxiálquilenos, propionaldehído con polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli (beta-aminoácidos) (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, ácidos colónicos u otros polímeros de polisacáridos, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos.

[0157] El grupo hidrófilo, por ejemplo, cadena de polietilenglicol, según algunas realizaciones, tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En una realización, el grupo hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente de 500 a aproximadamente 5.000 Daltons, o aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En otra realización, el grupo hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Daltons. En aún otras realizaciones de ejemplo, el grupo hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0158] En una realización, los dextranos se utilizan como el grupo hidrófilo. Los dextranos son polímeros de polisacáridos de subunidades de glucosa, predominantemente unidas por uniones α 1-6. El dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, por ejemplo, de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 100 kD, o de aproximadamente 5, 10, 15 ó 20 kD a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ó 90 kD.

[0159] Se contemplan polímeros lineales o ramificados. Las preparaciones resultantes de conjugados pueden ser esencialmente monodispersas o polidispersas, y pueden tener aproximadamente 0,5, 0,7, 1, 1,2, 1,5 ó 2 grupos de polímeros por péptido antagonista.

[0160] En una realización, el grupo hidrófilo es una cadena de polietilenglicol (PEG), opcionalmente unida al antagonista en una o más de las posiciones 1, 16, 17, 21, 24, 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), una posición dentro de la extensión C-terminal, por ejemplo, 30, o en el aminoácido N o C-terminal. En algunas realizaciones, el aminoácido nativo en esa posición está sustituido por un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con grupos hidrófilos, para facilitar la unión del grupo hidrófilo al antagonista. En realizaciones de ejemplo, el aminoácido nativo en esa posición está sustituido por un residuo de Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil fenilalanina. En otras realizaciones, se añade péptido en el extremo N o C-terminal un aminoácido modificado para comprender un grupo hidrófilo.

Conjugados y fusión

[0161] La presente descripción también abarca otros conjugados en los que los antagonistas de glucagón de la invención están unidos, opcionalmente a través de un enlace covalente y opcionalmente a través de un enlazador, a un conjugado. La unión se puede realizar mediante enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas, tales interacciones electrostáticas, enlace de hidrógeno, fuerzas iónicas, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrófobas o hidrófilas. Se puede utilizar una variedad de sistemas de acoplamiento no covalentes, incluyendo biotina-avidina, ligando/receptor, enzima/sustrato, proteína/unión a ácido nucleico/ácido nucleico, lípido/proteína de unión a lípido, compañeros de moléculas de adhesión celular; o cualquier compañero o fragmento de unión de los mismos que tienen afinidad entre sí.

[0162] El antagonista puede estar unidos a grupos de conjugación a través de unión covalente directa mediante la reacción de los residuos de aminoácidos diana del antagonista con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de los extremos N o C-terminales de estos aminoácidos diana. Los grupos reactivos en el antagonista o conjugado incluyen, por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino. Los agentes de derivatización incluyen, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica. Alternativamente, los grupos conjugadas se pueden unir al antagonista indirectamente a través de portadores intermedios, tales como polisacáridos o polipéptidos portadores. Ejemplos de portadores de polisacáridos incluyen aminodextrano. Ejemplos de portadores de polipéptidos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, copolímeros de los mismos, y los polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para conferir propiedades de solubilidad deseables en el portador cargado resultante.

[0163] Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más habitualmente con α -haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo- β -(5-imidozilo)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

[0164] Los residuos de histidilo se derivan mediante la reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

[0165] Los residuos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

[0166] Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al elevado pK_a del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo épsilon-amino de arginina.

[0167] La modificación específica de los residuos de tirosilo se puede realizar, con especial interés en la introducción de marcadores espectrales en los residuos tirosilo, mediante la reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más habitualmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

[0168] Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimidas ($R-N=C=N-R'$), en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4 etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

[0169] Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)), la desamidación de glutamina o asparagina, la acetilación de la amina N-terminal, y/o la amidación o esterificación del grupo ácido carboxílico C-terminal.

[0170] Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al antagonista. Se puede unir un azúcar o azúcares a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 publicado 11 de septiembre 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit.*

[0171] *Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

[0172] Los grupos conjugados de ejemplo que se pueden unir a cualquiera de los antagonistas de glucagón descritos en este documento incluyen, pero sin limitación, un péptido o polipéptido heterólogo (incluyendo, por ejemplo, una proteína plasmática), un agente de reconocimiento, una inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o la región Fc), un marcador de diagnóstico, tal como un radioisótopo, fluoróforo o marcador enzimático, un polímero que incluye polímeros solubles en agua, u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En una realización, se proporciona un conjugado que comprende un antagonista de glucagón de la presente invención y una proteína plasmática, en el que la proteína plasmática se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas.

[0173] En algunas realizaciones, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o de 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, de 2 a 10 átomos, de 5 a 10 átomos, o de 10 a 20 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena en la cadena principal del enlazador se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N, y S. Los átomos de la cadena y los enlazadores se pueden seleccionar según su solubilidad (hidrofilicidad) esperada a fin de proporcionar un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que está sujeto a la escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas que se encuentran en el tejido u órgano o célula dianas. En algunas realizaciones, la longitud del enlazador es lo suficiente larga para reducir el potencial impedimento estérico. Si el enlazador es un enlace covalente o un enlace peptídico y el conjugado es un polipéptido, todo el conjugado puede ser una proteína de fusión. Dichos enlazadores peptídico pueden tener cualquier longitud. Los enlazadores de ejemplo tienen de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, de 5 a 50, de 3 a 5, de 5 a 10, de 5 a 15, o de 10 a 30 aminoácidos de longitud. Dichas proteínas de fusión pueden producirse, alternativamente, mediante métodos de ingeniería genética recombinante conocidos para un experto en la materia.

[0174] Tal como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, los antagonistas de glucagón se conjugan, por ejemplo, se fusionan a una inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o región Fc). Los tipos conocidos de inmunoglobulinas (Ig) incluyen IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. La región Fc es una región C-terminal de una cadena pesada de Ig, que es responsable de la unión a los receptores Fc que llevan a cabo actividades, tales como

el reciclaje (que da lugar a una vida media prolongada), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0175] Por ejemplo, según algunas definiciones, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde la Cys226 al extremo C-terminal de la cadena pesada. La "región bisagra" generalmente se extiende desde Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 mediante la alineación de las cisteínas implicadas en la unión a cisteína). La región Fc de una IgG incluye dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 341. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende entre los aminoácidos 342 a 447. Las referencias a la numeración de amino ácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, o regiones, se basan todas en Kabat et al. 1991, Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico, Departamento de Salud Pública, Bethesda, MD. En realizaciones relacionadas, la región Fc puede comprender una o más regiones constantes modificadas o nativas de una cadena pesada de inmunoglobulina, diferente de CH1, por ejemplo, las regiones CH2 y CH3 de IgG e IgA, o las regiones CH3 y CH4 de IgE.

[0176] Los grupos de conjugado adecuados incluyen partes de secuencia de inmunoglobulina que incluyen el sitio de unión a FcRn. El FcRn, un receptor de salvamento, es responsable del reciclaje de inmunoglobulinas y su retorno a la circulación en la sangre. La región de la parte Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister et al 1994, Nature 372: 379). El área de contacto principal de la Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los sitios de contacto principales incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3.

[0177] Algunos grupos de conjugado pueden incluir o no un sitio o sitios de unión a FcγR. FcγR son responsables de ADCC y CDC. Los ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra inferior), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'E), y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G) (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000). La región bisagra inferior de IgE también se ha implicado en la unión a FcRI (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568 a 15578, 1997). Los residuos implicados en la unión al receptor de IgA se describen en Lewis et al., (J Immunol. 175: 6694-701, 2005). Los residuos de aminoácidos implicados en la unión al receptor de IgE se describen en Sayers et al. (J Biol Chem. 279 (34): 35320-5, 2004).

[0178] Las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse en la región Fc de una inmunoglobulina. Dichas regiones Fc variantes comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH3 de la región Fc (residuos 342-447) y/o al menos una modificación de aminoácido en el dominio CH2 de la región Fc (residuos 231-341). Las mutaciones que se cree que transmiten una mayor afinidad por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591). Otras mutaciones pueden reducir la unión de la región Fc a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y/o FcγRIIIA sin reducir significativamente la afinidad por FcRn. Por ejemplo, la sustitución de Asn en la posición 297 de la región Fc por Ala u otro aminoácido elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado y puede dar lugar a una inmunogenicidad reducida con una vida media prolongada concomitante de la región Fc, así como una unión reducida a FcγRs (Routledge et al 1995, Transplantation 60: 847; Friend et al 1999, Transplantation 68: 1632; Shields y otros, 1995, J. Biol. Chem. 276: 6591). Se han realizado modificaciones de aminoácidos en las posiciones 236 233 de IgG1 han sido hechos que reducen la unión a FcγRs (Ward y Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 y Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29: 2613). Algunas sustituciones de aminoácidos de ejemplo se describen en las Patentes de Estados Unidos 7.355.008 y 7.381.408, cada una incorporada aquí como referencia en su totalidad.

[0179] La presente descripción también abarca péptidos o proteínas de fusión de glucagón, en los que un segundo péptido o polipéptido se ha fusionado a un extremo terminal, por ejemplo, el extremo carboxi terminal del antagonista de glucagón. En algunas realizaciones, el segundo péptido añadido al extremo carboxilo del antagonista de glucagón es GPSSGAPPPS, KRNRNNIA o KRNR unidas al aminoácido 29 del antagonista de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). En otras realizaciones, el segundo péptido es XGPSSGAPPPS, en el que X se selecciona entre uno de los 20 aminoácidos comunes, por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico o glicina. En una realización, X representa un aminoácido, por ejemplo, Cys, que comprende además un grupo hidrófilo unido de forma covalente a la cadena lateral de dicho aminoácido. Dichas extensiones C-terminals mejoran la solubilidad y también pueden mejorar la actividad del glucagón o GLP-1. En algunas realizaciones, en las que el antagonista de glucagón comprende además una extensión carboxi terminal, el aminoácido carboxi terminal de la extensión termina en un grupo amida o un grupo éster en lugar de un ácido carboxílico.

[0180] En algunas realizaciones, por ejemplo, en antagonistas de glucagón que comprenden la extensión C-terminal, la treonina en la posición 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) se sustituye por una glicina. Por ejemplo, un antagonista de glucagón que tiene una sustitución de glicina por treonina en la posición 29 y que comprende la extensión C-terminal de GPSSGAPPPS es cuatro veces tan potente en el receptor de GLP-1 como el glucagón nativo modificado para comprender la misma extensión C-terminal. Esta sustitución T29G se puede utilizar en combinación con otras modificaciones descritas en el presente documento para mejorar la afinidad de los antagonistas de glucagón para el receptor de GLP-1.

[0181] En algunas realizaciones, se añade un aminoácido al extremo C-terminal, y el aminoácido adicional se selecciona de del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico y glicina.

5 [0182] La presente descripción también abarca multímeros de los antagonistas de glucagón modificados descritos en este documento. Dos o más de los antagonistas de glucagón modificados pueden unirse entre sí usando agentes y procedimientos de reticulación estándar conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden formarse dímeros entre dos antagonistas de glucagón modificados mediante el uso de agentes de reticulación bifuncionales tiol y
10 agentes de reticulación de amina bi-funcionales, en particular para los antagonistas de glucagón que han sido sustituidos con residuos de cisteína, lisina, ornitina, homocisteína o acetilfenil alanina.

Acilación y alquilación

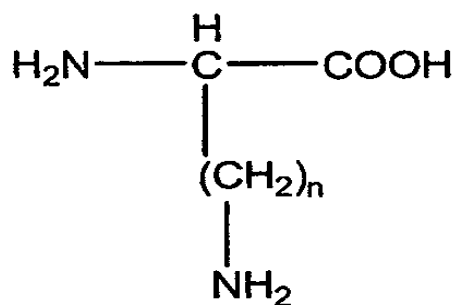
15 [0183] Según algunas realizaciones, los antagonistas de glucagón descritos en este documento se modifican para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo. La acilación o alquilación pueden aumentar la vida media de los antagonistas de glucagón en circulación. La acilación o alquilación pueden retrasar ventajosamente el inicio de la acción y/o extender la duración de la acción en los receptores de glucagón y/o GLP-1 y/o mejorar la resistencia a proteasas, tales como DPP-IV y/o mejorar la solubilidad. En algunas realizaciones, la potencia de los antagonistas de glucagón acilados es comparable a las versiones no aciladas de los antagonistas de glucagón. Los antagonistas de glucagón se
20 pueden acilar o alquilar en la misma posición de aminoácido en la que está unido un grupo hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente.

[0184] En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un antagonista de glucagón modificado para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo unido covalentemente al aminoácido en la posición 10 del antagonista de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). El antagonista de glucagón puede comprender además un espaciador entre el aminoácido en la posición 10 del antagonista del glucagón y el grupo acilo o alquilo. En algunas realizaciones, el grupo acilo es un ácido graso o ácido biliar, o sal de los mismos, por ejemplo, un ácido graso de C4 a C30, un ácido graso de C8 a C24, ácido cólico, un alquilo C4 a C30, un alquilo C8 a C24, o un grupo alquilo que comprende un grupo esteroide de un ácido biliar. El espaciador es cualquier grupo con grupos reactivos adecuados para la unión de grupos acilo o alquilo. En realizaciones de ejemplo, el espaciador comprende un aminoácido, un dipéptido, o un tripéptido, o un espaciador bifuncional hidrófilo. En algunas realizaciones, el espaciador se selecciona del grupo que consiste en: Trp, Glu, Asp, Cys y un espaciador que comprende $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, en el que m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12. Dichos antagonistas de glucagón acilados o alquilados también pueden comprender además un grupo hidrófilo, opcionalmente un polietilenglicol. Cualquiera de los antagonistas de glucagón anteriores puede comprender dos grupos acilo o dos grupos alquilo, o una combinación de los mismos.

[0185] La acilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del antagonista del glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, siempre que la actividad del antagonista de glucagón (y opcionalmente la actividad de GLP-1) se mantenga. Los ejemplos no limitantes incluyen las posiciones 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). El grupo acilo puede unirse covalentemente directamente a un aminoácido del antagonista de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del antagonista de glucagón a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido del antagonista de glucagón y el grupo acilo. Los antagonistas de glucagón se pueden acilar en la misma posición de aminoácido en el que está unido un grupo hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Los ejemplos no limitantes incluyen la acilación en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del antagonista de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

[0186] En un aspecto específico de la invención, el antagonista de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante acilación directa de una amina, hidroxilo, o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del antagonista de glucagón. En algunas realizaciones, el antagonista de glucagón se acila directamente a través de la amina, hidroxilo o tiol de la cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones, la acilación está en la posición 10, 20, 24, ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). En este sentido, el antagonista de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) modificado a cualquier aminoácido que comprenda una amina, hidroxilo, o tiol en la cadena lateral. En algunas realizaciones específicas de la invención, la acilación directa del antagonista de glucagón se produce a través de la amina, hidroxilo, o tiol en la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje).

65 [0187] En algunas realizaciones, el aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral es un aminoácido de fórmula I:

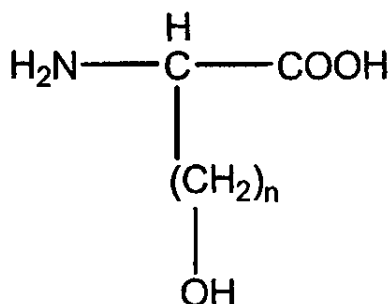


en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula I]

En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula I, es el aminoácido en el que n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

[0188] En otras realizaciones, el aminoácido que comprende un grupo hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II:

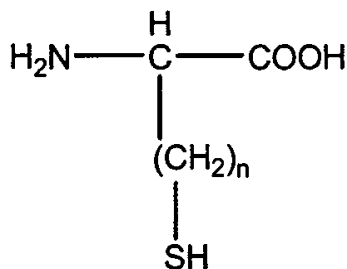


en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula II]

En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Ser).

[0189] En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tiol en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula III:



en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula III]

En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Cys).

[0190] En una realización de la invención, el antagonista de glucagón acilado comprende un espaciador entre el antagonista y el grupo acilo. En algunas realizaciones, el antagonista de glucagón está unido covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo acilo. En algunas realizaciones de ejemplo, el antagonista de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante acilación de una amina, hidroxilo, o tiol de un espaciador, cuyo espaciador está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24, ó 29 (según la

- numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), o en el aminoácido C-terminal del antagonista de glucagón. El aminoácido al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprenda un grupo que permita la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende NH_2 , OH , o -COOH en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En este sentido, el antagonista de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) modificado a cualquier aminoácido que comprende amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral.
- [0191]** En algunas realizaciones, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral, o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral.
- [0192]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo amina de un espaciador, la acilación puede tener lugar a través de la amina alfa del aminoácido o una amina de la cadena lateral. En el caso en el que se acila la amina alfa, el aminoácido espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu. En el caso en el que se acila la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador, el aminoácido espaciador es un aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula I (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible acilar la amina alfa y la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador, de manera que el antagonista de glucagón se diacila. Las realizaciones de la invención incluyen tales moléculas diaciladas.
- [0193]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo hidroxilo de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula II. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Ser.
- [0194]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo tiol de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula III. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Cys.
- [0195]** En una realización, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli (alquilo) carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, en el que m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible comercialmente de Peptides International, Inc. (Louisville, KY).
- [0196]** Los métodos adecuados de acilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos y tioles son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19 (para los métodos de acilación a través de una amina), Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996); Shimohigashi y Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982); y Previero et al, Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972) (para métodos de acilación a través de un hidroxilo); y San y Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (para métodos de acilación a través de un tiol); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications", páginas 1, 2-12: (1990); Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity", Vol. 6, No: 2 pág. 171-176 (1989).
- [0197]** El grupo acilo del antagonista de glucagón acilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cualquier longitud de cadena de carbono, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones específicas de la invención, el grupo acilo es un ácido graso de C4 a C30. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de un ácido graso C4, ácido graso C6, ácido graso C8, ácido graso C10, ácido graso C12, ácido graso C14, ácido graso C16, ácidos graso C18, ácidos graso C20, ácido graso C22, ácido graso C24, ácidos graso C26, ácido graso C28, o ácido graso C30. En algunas realizaciones, el grupo acilo es un ácido graso C8 a C20, por ejemplo, un ácido graso C14 o un ácido graso C16.
- [0198]** En una realización alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo, pero sin limitación, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico, y ácido colesterol.
- [0199]** Los antagonistas de glucagón acilados descritos en este documento se pueden modificar adicionalmente para comprender un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones específicas, el grupo hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un grupo hidrófilo se puede realizar a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en este documento. En este sentido, el antagonista de glucagón acilado puede comprender la SEQ ID NO: 1, incluyendo cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento, en el que (a) al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) comprende un grupo acilo y (b) al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24, ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, se modifican a una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del

aminoácido está unida covalentemente a un grupo hidrófilo (por ejemplo, PEG). En algunas realizaciones, el grupo acilo está unido a la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), opcionalmente a través de un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y el grupo hidrófilo se incorpora en un residuo de Cys en la posición 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje).

[0200] Alternativamente, el antagonista de glucagón acilado puede comprender un espaciador, en el que el espaciador está acilado y modificado para comprender el grupo hidrófilo. Los ejemplos no limitantes de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, y Ac-Phe.

[0201] Según una realización, el antagonista de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo que está unido al antagonista de glucagón a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida, o alquilamina para los propósitos de prolongación de la vida media en circulación y/o el retraso de la aparición y/o extensión de la duración de la acción y/o la mejora de la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV.

[0202] La alquilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del antagonista del glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, siempre que la actividad antagonista de glucagón (y opcionalmente la actividad de GLP-1) se mantenga. Los ejemplos no limitantes incluyen las posiciones 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). El grupo alquilo puede unirse covalentemente directamente a un aminoácido del antagonista de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del antagonista de glucagón a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido del antagonista de glucagón y el grupo alquilo. Los antagonistas de glucagón se pueden alquilar en la misma posición de aminoácido en la que está unido un grupo hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Los ejemplos no limitantes incluyen la alquilación en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) y la pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del antagonista de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

[0203] En un aspecto específico de la invención, el antagonista de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación directa de una amina, hidroxilo, o tior de una cadena lateral de un aminoácido del antagonista de glucagón. En algunas realizaciones, el antagonista del glucagón se alquila directamente a través de la amina, hidroxilo o tior en la cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones, la alquilación es en la posición 10, 20, 24, ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). En este sentido, el antagonista de glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tior en la cadena lateral. En algunas realizaciones específicas de la invención, la alquilación directa del antagonista de glucagón se produce a través de la amina, hidroxilo, o tior de la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje).

[0204] En algunas realizaciones, el aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula I. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula I es el aminoácido en el que n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

[0205] En otras realizaciones, el aminoácido que comprende un hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el ácido amino en el que n es 1 (Ser).

[0206] En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tior en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula III. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el ácido amino en el que n es 1 (Cys).

[0207] En una realización de la invención, el antagonista de glucagón alquilado comprende un espaciador entre el antagonista y el grupo alquilo. En algunas realizaciones, el antagonista de glucagón se une covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo alquilo. En algunas realizaciones de ejemplo, el antagonista de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación de una amina, hidroxilo, o tior de un espaciador, cuyo espaciador está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24, ó 29 del antagonista de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje). El aminoácido al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprende un grupo que permite la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende NH₂, -OH, o -COOH en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En este sentido, el antagonista de glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato en la cadena lateral.

[0208] En algunas realizaciones, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol en la cadena lateral.

5 **[0209]** Cuando la alquilación se produce a través de un grupo amina de un espaciador, la alquilación puede tener lugar a través de la amina alfa del aminoácido o una amina de la cadena lateral. En el caso en el que la amina alfa está alquilada, el aminoácido espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu. En el caso en el que la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador está alquilada, el aminoácido espaciador es un aminoácido que comprende una amina de la cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula I (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible alquilar la amina alfa y la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador, de manera que el antagonista de glucagón se dialquila. Las realizaciones de la invención incluyen tales moléculas dialquiladas.

10 **[0210]** Cuando la alquilación se produce a través de un grupo hidroxilo de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula II. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Ser.

15 **[0211]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo tiol de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula III. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Cys.

20 **[0212]** En una realización, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli(alquilo)carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, en el que m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible comercialmente de Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

25 **[0213]** Los métodos adecuados de alquilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos, y tioles son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una síntesis de éteres de Williamson para formar un enlace éter entre el antagonista de glucagón y el grupo alquilo. Además, una reacción de sustitución nucleófila del péptido con un haluro de alquilo puede dar lugar a cualquiera de un enlace éster, éter, tioéter, amida, o alquilamina.

30 **[0214]** El grupo alquilo del antagonista de glucagón alquilado puede tener cualquier tamaño, por ejemplo, cualquier longitud de cadena de carbonos, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones de la invención, el grupo alquilo es un alquilo C1 a C30. Por ejemplo, el grupo alquilo puede ser cualquiera de un grupo alquilo C4, alquilo C6, alquilo C8, alquilo 10, alquilo C12, alquilo C14, alquilo C16, alquilo C18, alquilo C20, alquilo C22, alquilo C24, alquilo C26, alquilo C28, o alquilo C30. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C8 a C20, por ejemplo, un alquilo C14 o un alquilo C16.

35 **[0215]** En algunas realizaciones específicas, el grupo alquilo comprende un grupo esteroide de un ácido biliar, por ejemplo, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico, y ácido colesterol.

40 **[0216]** Los antagonistas de glucagón alquilados descritos en este documento se pueden modificar adicionalmente para comprender un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones específicas, el grupo hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un grupo hidrófilo se puede realizar a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en este documento. En este sentido, el antagonista de glucagón alquilado puede comprender la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones descritas en el presente documento, en el que (a) al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje) comprende un grupo alquilo y (b) al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, se modifican a una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un grupo hidrófilo (por ejemplo, PEG). En algunas realizaciones, el grupo alquilo está unido a la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), opcionalmente a través de un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y el grupo hidrófilo se incorpora en un residuo de Cys en la posición 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje).

45 **[0217]** Alternativamente, el antagonista de glucagón alquilado puede comprender un espaciador, en el que el espaciador está alquilado y modificado para comprender el grupo hidrófilo. Los ejemplos no limitantes de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, y Ac-Phe.

50 **EJEMPLOS**

[0218] Los compuestos de la presente invención se pueden preparar mediante métodos sintéticos estándar, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro método de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no se pueden expresar mediante técnicas estándar de ADN recombinante, las técnicas para su preparación son conocidas en la técnica. Los compuestos de la presente invención que abarcan partes no peptídicas pueden sintetizarse mediante reacciones estándar de química orgánica, además de las reacciones estándar de química de péptidos cuando sea aplicable.

Protocolo de síntesis general:

[0219] Los análogos de glucagón se sintetizaron utilizando el acoplamiento individual de "Fast Boc" activado por HBTU partiendo de 0,02 mmol de resina Boc Thr(OBzl)Pam en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430 A modificado. Los aminoácidos de Boc y HBTU se obtuvieron de Midwest Biotech (Fishers, IN). Los grupos protectores de cadena lateral utilizados 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 la cadena lateral en el extremo N-terminal His fue Boc.

[0220] Cada resina de peptidilo completado se trató con una solución de piperidina al 20% en dimetilformamida para eliminar el grupo formilo del triptófano. Se realizaron escisiones con fluoruro de hidrógeno líquido en presencia de p-cresol y sulfuro de dimetilo. La escisión se realizó durante 1 hora en un baño de hielo usando un aparato de HF (Penninsula Labs). Después de la evaporación del HF, el residuo se suspendió en éter dietílico y se filtraron los materiales sólidos. Cada péptido se extrajo en 30-70 ml de ácido acético acuoso y se analizó una alícuota diluida mediante HPLC [Beckman System Gold, C8 0,46x5cm Zorbax, 1 ml/min, 45°C, 214 nm, tampón A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/90% de acetonitrilo, gradiente de 10% a 80% de B durante 10 min].

[0221] La purificación se realizó en una FPLC sobre una columna C18 2,2 x 25 cm Kromasil mientras se monitorizaba la luz UV a 214 nm y se recogían fracciones de 5 minutos. Las fracciones homogéneas se combinaron y se liofilizaron para producir un producto de pureza > 95%. La masa molecular correcta y la pureza se confirmaron mediante análisis espectral de masas con MALDI.

Protocolo general de pegilación: (Cys-maleimido)

[0222] Habitualmente, el análogo de glucagón Cys se disuelve en solución salina tamponada de fosfato (de 5 a 10 mg/ml) y se añade ácido etilendiaminotetraacético 0,01 M (10-15% del volumen total). Se añade un exceso (2 veces) de reactivo maleimido metoxiPEG (Nektar) y la reacción se agita a temperatura ambiente mientras se monitoriza el progreso de la reacción mediante HPLC. Después de 8-24 horas, la mezcla de reacción se acidifica y se carga sobre una columna preparativa de fase inversa para la purificación utilizando el gradiente TFA al 0,1%/acetonitrilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para producir los derivados pegilados deseados.

EJEMPLO 1

Síntesis de glucagón Cys¹⁷ (1-29) y análogos de MonoCys similares

[0223] Se introdujeron 0,2 mmol de resina Boc Thr(OBzl) Pam (SynChem Inc) en un recipiente de reacción de 60 ml y se desarrolló la siguiente secuencia en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430 A modificado usando acoplamientos individuales de Fast Boc activado por HBTU

HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 32)

Se utilizaron 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). Se trató la resina de peptidilo completada con piperidina al 20%/dimetilformamida para eliminar la protección de Trp formilo, a continuación se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó a vacío. Se añadieron 1,0 ml de p-cresol y 0,5 ml de sulfuro de dimetilo junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato de HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó, y se condensaron aproximadamente 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora, a continuación se extrajo el HF al vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se desarrolló una HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45°C, 214 nm, tampón A de TFA al 0,1%, tampón B de TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] con una pequeña muestra del extracto de separación. El extracto restante se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo utilizando un sistema FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%. Gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min.

[0224] Las fracciones que contenían el producto más puro (48-52) se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para producir 30,1 mg. Un análisis de HPLC del producto mostró una pureza de > 90% y el análisis espectral de masas MALDI mostró la masa deseada de 3429,7. El Glucagón Cys²¹, Glucagón Cys²⁴, y Glucagón Cys²⁹ se prepararon de manera similar.

EJEMPLO 2

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

[0225] Se colocaron 285 mg (0,2 mmol) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) en un recipiente de reacción de 60 ml y se introdujo la siguiente secuencia y se desarrolló en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando acoplamientos individuales de Fast Boc activado por HBTU.

HSQGTFTSD YSKYLDSRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 33)

Se utilizaron 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). Se trató la resina de peptidilo completada con piperidina al 20%/dimetilformamida para eliminar la protección de Trp formilo, a continuación se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó a vacío. Se añadieron 1,0 ml de p-cresol y 0,5 ml de sulfuro de dimetilo junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato de HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó, y se condensaron aproximadamente 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora, a continuación se extrajo el HF al vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se desarrolló una HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm, tampón A de TFA al 0,1%, tampón B de TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] sobre una alícuota del extracto de separación. El extracto se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo para la elución utilizando un sistema FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%. Gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min. Las fracciones 58-65 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para producir 198,1 mg.

[0226] El análisis por HPLC del producto mostró una pureza superior al 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 manera similar como los ácidos carboxílicos C-terminales empezando con la resina de PAM cargada apropiadamente.

EJEMPLO 3

Glucagón Cys¹⁷ Mal-PEG-5K

[0227] Se disolvieron 15,1 mg de Glucagón Cys¹⁷ (1-29) y 27,3 mg de metoxi poli(etilenglicol)maleimida de peso molecular promedio de 5.000 (mPEG-MAL-5000, Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitorizó mediante análisis por HPLC [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min]. Después de 5 horas, la mezcla de reacción se cargó sobre una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm. Se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en un FPLC de Pharmacia mientras se monitorizaba la UV a 214 nm y se recogían fracciones de 5 min. A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%, gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 25,9 mg.

[0228] Este producto se analizó por HPLC [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] y mostró una pureza de aproximadamente el 90%. El análisis espectral de masas MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) mostró un amplio rango de masas (típico de derivados de PEG) de 8.700 a 9.500. Esto demuestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3429) de aproximadamente 5.000 u.m.a.

EJEMPLO 4

Glucagón Cys²¹ Mal-PEG-5K

[0229] Se disolvieron 21,6 mg de Glucagón Cys²¹ (1-29) y 24 mg de mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M. La reacción se agitó a la temperatura ambiente. Después de 2 horas, se añadieron otros 12,7 mg de mPEG-MAL-5000. Después de 8 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en una FPLC de Pharmacia a 4 ml/min, mientras se recogían fracciones de 5 min. A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Gradiente = 20% a 80% de B durante 450 min.

[0230] Las fracciones correspondientes a la aparición de producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 34 mg. El análisis del producto por HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al

0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] mostró un producto homogéneo que era diferente del péptido de glucagón de partida. El análisis espectral de masas MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) mostró un amplio rango de masas (típico de derivados de PEG) de 8.700 a 9.700. Esto demuestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3470) de aproximadamente 5.000 u.m.a.

EJEMPLO 5

Glucagón Cys²⁴ Mal-PEG-5K

[0231] Se disolvieron 20,1mg de Glucagón C²⁴ (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 horas, a continuación 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 preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo usando una FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%, gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 45,8 mg. El análisis espectral de masas MALDI mostró una típica señal amplia de PEG con un máximo a 9175,2 que es de aproximadamente 5.000 u.m.a. más que el glucagón C²⁴ (3.457,8).

EJEMPLO 6

Glucagón Cys²⁴ Mal-PEG-20K

[0232] Se disolvieron 25,7 mg de Glucagón Cys²⁴ (1-29) y 40,7 mg de mPEG-Mal-20K (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 6 horas, la relación de material de partida con respecto a producto era de aproximadamente 60:40, según se determinó por HPLC. Se añadieron otros 25,1mg de mPEG-Mal-20K y la reacción se dejó agitar otras 16 horas. La relación de producto no había mejorado de manera significativa, por lo que la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa Kromasil C18 2,2 x 25 cm y se purificó en una FPLC de Pharmacia usando un gradiente de 30% de B a 100% de B durante 450 min. Tampón A = TFA al 0,1%, tampón B = TFA al 0,1%/ACN al 50%, flujo = 4 ml/min, y se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitoriza la UV a 214 nm (2,0 A). Las fracciones que contenían producto homogéneo se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 25,7 mg. La pureza determinada por HPLC analítica fue ~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 C²⁴ de partida (3.457,8).

EJEMPLO 7

Glucagón Cys <²⁹> Mal-PEG-5K

[0233] Se disolvieron 20,0 mg de Glucagón Cys²⁹ (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 completar la reacción. Después de 8 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en un sistema de FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 75-97 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 40,0 mg de producto que es diferente que el material de partida recuperado en HPLC (fracciones 58-63). El análisis del producto por HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 0% de B a 80 % de B durante 10 min] mostró una pureza superior al 95%. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de un componente de PEG con un rango de masas de 8.000 a 10.000 (máximo a 9025,3) que es 5.540 u.m.a. superior al material de partida (3484,8).

EJEMPLO 8

Glucagón Cys²⁴ (2-butirolactona)

[0234] A 24,7 mg de glucagón Cys²⁴ (1-29) se añadieron 4 ml de bicarbonato de amonio 0,05 M/acetonitrilo al 50% y 5,5 µl de una solución de γ-lactona del ácido 2-bromo-4-hidroxibutírico (100 µl en 900 µl de acetonitrilo). Después de 3 horas de agitación a temperatura ambiente, se añadieron otros 105 µl de la solución de lactona a la mezcla de reacción, que se agitó otras 15 horas. La mezcla de reacción se diluyó hasta 10 ml con ácido acético acuoso al 10% y se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm. Se desarrolló un gradiente de acetonitrilo (20% de B a 80% de B durante 450 min) una FPLC de Pharmacia, mientras se recogían fracciones de 5 min y se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). Flujo = 4 ml/min, A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 74-77 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 7,5 mg. El análisis por HPLC mostró una pureza del 95% y el análisis espectral de masas MALDI mostró una masa de 3540,7 ó 84 unidades de masa más que material de partida. Este resultado es consistente con la adición de un único grupo de butirolactona.

NC(=O)C(CSC1CCOC1=O)C(=O)NCCSC2CCOC2=O

SEO ID NO: 34

Peso molecular = 3541.91

Masa exacta = 3538

Fórmula molecular = C 155 H 226 N 42 O 50 S2

EJEMPLO 9

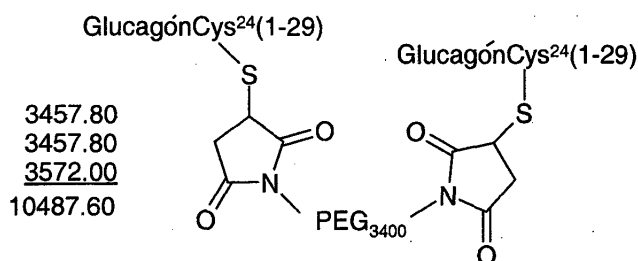
Glucagón Cys²⁴ (S-carboximetilo)

[0235] Se disolvieron 18,1 mg de Glucagón Cys²⁴ (1-29) en 9,4 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH = 9,2) y se añadieron 0,6 ml de una solución de ácido bromoacético (1,3 mg/ml en acetonitrilo). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se siguió mediante HPLC analítica. Después 1 h se añadieron otros 0,1 ml de una solución de ácido bromoacético. La reacción se agitó otros 60 min, a continuación se acidificó con ácido acético acuoso y se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm para la purificación. Se desarrolló un gradiente de acetonitrilo FPLC de Pharmacia (flujo = 4 ml/min), mientras se recogían fracciones de 5 min y se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 26-29 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir varios mg de 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.

EJEMPLO 10

Dímero de Glucagón Cys²⁴ maleimido, PEG-3,4K

[0236] Se disolvieron 16 mg de glucagón Cys²⁴ y 1,02 mg de Mal-PEG-Mal-3400, poli(etilenglicol)bismaleimida de peso molecular promedio 3.400, (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada de fosfato y se añadieron 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 Cys²⁴ y continuó la agitación. Después de aproximadamente 40 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna PepRPC 16/10 de Pharmacia y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en FPLC de Pharmacia, mientras se recogían fracciones de 2min y se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 Å). Flujo = 2 ml/min, A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 69-74 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 10,4 mg. La HPLC analítica mostró una pureza del 90% y el análisis espectral de masas MALDI muestra un componente en el intervalo de 9.500-11.000 que es consistente con el dímero deseado.



EJEMPLO 11

Ensayos de solubilidad del glucagón:

[0237] 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 madre a 1 ml con HCl 0,01 N y se determina la absorbancia UV (276 nm). El pH de la solución madre restante se ajusta a pH 7 usando 200-250 µl de Na₂HPO₄ 0,1 M (pH 9,2). La solución se deja reposar durante la noche a 4°C, a

continuación se centrifuga. A continuación, se diluyen 100 µl de sobrenadante a 1 ml con HCl 0,01 N, y se determina la absorbancia UV (por duplicado).

[0238] La lectura de absorbancia inicial se compensa por el aumento de volumen y se utiliza el siguiente cálculo para establecer el porcentaje de solubilidad:

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

Los resultados se muestran en la tabla 1, en la que Glucagón-Cex representa el glucagón de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) más la adición de un carboxi terminal de SEQ ID NO: 19 y Glucagón-Cex R¹² representa la SEQ ID NO: 48.

Tabla 1: Datos de solubilidad para análogos de glucagón

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

EJEMPLO 12

Ensayo de unión al receptor de glucagón

[0239] La afinidad de los péptidos hacia el receptor de glucagón se midió en un ensayo de unión por competición utilizando la tecnología de ensayo de proximidad de centelleo. Se mezclaron diluciones en serie de 3 veces de los péptidos realizadas en tampón de ensayo de proximidad de centelleo (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, albúmina de suero bovino al 0,1% p/v) en placas de base blanca/clara de 96 pocillos (Corning Inc., Acton, MA) con (3 - [¹²⁵I]-yodotirosil) Tyr10 glucagón 0,05 nM (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6 microgramos por pocillo, fragmentos de membrana plasmática preparados a partir de células que sobreexpresan receptor de glucagón humano, y 1 mg/pocillo de partículas de ensayo de proximidad de centelleo con aglutinina tipo A de germen de trigo tratado con polietilenimina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tras 5 min de agitación a 800 rpm en un agitador rotatorio, la placa se incubó 12 h a temperatura ambiente y a continuación se leyó en un contador de centelleo líquido MicroBeta1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Se midió la radioactividad no unida específicamente (NSB) en los pocillos con 4 veces mayor concentración de ligando nativo "frío" que la concentración más alta en muestras de ensayo y se detectó la radiactividad unida total en los pocillos con ningún competidor. Se calculó el porcentaje de unión específica de la siguiente manera: % unión específica = ((unida - NSB)/(unida total - NSB)) X 100. Los valores de IC₅₀ se determinaron mediante el uso de software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

EJEMPLO 13

Ensayo funcional - Síntesis de cAMP

[0240] La capacidad de los análogos de glucagón para inducir cAMP se midió en un ensayo indicador basado en luciferasa de luciérnaga. Se privaron de suero células HEK293 cotransfectadas con receptor de glucagón o de GLP-1 y gen de luciferasa unido a un elemento de respuesta de cAMP mediante el cultivo de 16h en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero de crecimiento bovino al 0,25% (HyClone, Logan, UT) y a continuación, se incubaron con diluciones en serie de glucagón, GLP-1 o nuevos análogos de glucagón durante 5 horas a 37°C, 5% de CO₂ en placas "Biocoat" de 96 pocillos recubiertos de poli-D-lisina (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 oscuro y claro, y el resultado se midió en un contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones con 50% de eficacia se calcularon mediante el uso de software Origin (OriginLab, Northampton, MA). Los resultados se muestran en la figura 3 y en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2 Inducción de cAMP por análogos de glucagón con extensión C-terminal

Péptido	Inducción de cAMP			
	Receptor de glucagón		Receptor de GLP-1	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , 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 KNR	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	10
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 C24	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 cAMP mediante análogos de glucagón pegilado

Péptido	Inducción de cAMP			
	Receptor de glucagón		Receptor de GLP-1	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , 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 C17 PEG 5K	0,37 ± 0,16	6	11,52 ± 3,68	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,22 ± 0,10	12	13,65 ± 2,95	4
Glucagón C17 PEG 5K	0,96 ± 0,07	2	12,71 ± 3,74	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,08 ± 0,05	3	No determinada	
Glucagón C24 Dimero	0,10 ± 0,05	3	No determinada	
GLP-1	>1000		0,05 ± 0,02	4
* - número de experimentos				

EJEMPLO 14

5

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

10

[0241] Cada análogo de glucagón se disolvió en agua o PBS y se llevó a cabo un primer análisis HPLC. Después de ajustar el pH (4, 5, 6, 7), las muestras se incubaron durante un período de tiempo especificado a 37°C y se reanalizaron por HPLC para determinar la integridad del péptido. Se determinó la concentración del péptido específico de interés y se calculó el porcentaje intacto restante en relación con el análisis inicial. Los resultados para glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} se muestran en las figuras 1 y 2.

EJEMPLO 15

15

Antagonistas de glucagón

[0242] Los antagonistas de glucagón se sintetizaron usando las siguientes estrategias generales:

20

Protocolo general de síntesis de péptidos con la estrategia de química Boc:

25

[0243] Los análogos de glucagón se sintetizaron usando acoplamiento individual de "Fast Boc" activado por HBTU partiendo de 0,2 mmol de resina de MBHA o una resina de Pam unida al primer aminoácido en un sintetizador de péptidos Applied Biosystem 430A modificado. Los aminoácidos de Boc y HBTU se obtuvieron de Midwest Biotech (Fishers, IN). Los grupos protectores de cadena lateral utilizados 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 ácido 3-fenil láctico (PLA) N-terminal (Aldrich, Milwaukee, WI) se acopló manualmente mediante BEPBT (3-(dietoxi-fosforilo)-3H-benzo[d][1,2,3]triazin-4-ona, Synchem Inc., Aurora, OH) después de la síntesis en fase sólida automatizada.

30

[0244] Después de la síntesis en fase sólida de péptidos, cada resina de peptidilo completada se trató con piperidina al 20%/DMF para eliminar el grupo formilo del triptófano. Se realizaron separaciones de fluoruro de hidrógeno líquido en presencia de p-cresol y sulfuro de dimetilo. La separación se realizó durante 1 hora en un baño de hielo usando un aparato de HF (Penninsula Labs). Después de la evaporación del HF, el residuo se suspendió en éter dietílico y se filtraron los materiales sólidos. Cada péptido se extrajo en 30-70 ml de ácido acético acuoso y se diluyó con agua y se

liofilizó. El péptido en bruto se analizó mediante HPLC analítica y se comprobó el peso molecular del péptido mediante espectrometría de masas ESI o MALDI-TOF. El péptido se purificó mediante el procedimiento general de purificación de HPLC.

5 Protocolo general de síntesis de péptidos con la estrategia de química de Fmoc:

[0245] Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A usando química Fmoc estándar con resina de amida Rink MBHA o resina Wang unida al primer aminoácido (Novabiochem, San Diego, CA) usando DIC/HOBT como reactivo de acoplamiento. Se acopló manualmente ácido 3-fenil láctico (PLA) mediante BEPBT después de la síntesis de péptidos automatizada. Los grupos protectores de la cadena lateral de los aminoácidos N-Fmoc [N-(9-fluorenil) metoxycarbonilo] fueron los siguientes: Arg, Pmc; Asp, OtBu; Cys, Trt; Gln, Trt; His, Trt; Lys, Boc; Ser, tBu, Tyr, tBu; y Trp, Boc (Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo, OtBu = éster de terc-butilo, Trt = tritilo, Boc = terc-butiloxycarbonilo, y tBu = éster de terc-butilo). Se utilizaron Fmoc-Cys (SO₃Na)-OH y Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH para la síntesis de los péptidos que contenían ácido cisteico y ácido homocisteico. Los péptidos se escindieron de la resina con un cóctel de escisión que contenía 85% de TFA, 5% de fenol, 5% de agua y 5% de tioanisol (se añadió EDT al 2,5% cuando el péptido contiene cisteína). Se precipitaron los péptidos en bruto en éter, se centrifugaron, y se liofilizaron. El péptido se analizó mediante HPLC analítica y se comprobó mediante espectrometría de masas ESI o MALDI-TOF. El péptido se purificó mediante el procedimiento general de purificación de HPLC.

20 Procedimiento general de HPLC analítica:

[0246] La HPLC analítica se realizó en un sistema HPLC Beckman System Gold con una columna Zorbax SB-C8 (0,46 x 5 cm, 5 µm, Agilent) con un gradiente de elución a un caudal de 1,0 ml/min y se monitorizó a 214 nm. Los gradientes se establecieron como 10% de B a 80% de B durante 10 min y después 10% de B durante 5 min. Tampón A = TFA al 0,1% y B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 90%.

Procedimiento de purificación general de HPLC preparativa:

[0247] Los péptidos se purificaron habitualmente en un sistema de monitores 486 conectados a Waters 600E con una columna HPLC semipreparativa (ZORBAX SB-C8, 21,2x250 mm, 7 µm, Agilent) monitorizada a 214 nm o 230 nm. Tampón A = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 10% y B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 90%. Los gradientes utilizados para la purificación fueron 0-30% de B durante 40 min, a continuación, 30-50% de B durante 30 minutos a un caudal de 12 ml/min si no se indica específicamente. Las fracciones se analizaron mediante HPLC analítica y se comprobaron mediante espectrometría de masas. Las fracciones con más del 90% de pureza se recogieron, liofilizaron y almacenaron. Las fracciones con una pureza entre el 60 y el 90% se combinaron, liofilizaron y se purificaron de nuevo.

[0248] Los derivados de análogos de glucagón pegilados se prepararon según el siguiente procedimiento general de Cys-maleimido. Habitualmente, el análogo de glucagón Cys se disuelve en solución salina tamponada de fosfato (5-10 mg/ml) y se añade ácido etilendiaminotetraacético 0,01 M (10-15% del volumen total). Se añade un exceso (1,5 ~ 2 veces) de reactivo de maleimido metoxiPEG (Nektar, Huntsville, AL) y la reacción se agita a temperatura ambiente mientras se monitoriza el progreso de la reacción mediante HPLC. Después de 2-24 horas, la mezcla de reacción se acidifica y se carga en una columna preparativa de fase inversa para la purificación utilizando gradientes de TFA al 0,1%/acetonitrilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para producir los derivados pegilados deseados. Para los péptidos que muestran baja solubilidad en PBS, los péptidos se disolvieron en acetonitrilo al 25% en agua o tampón de urea 4 ~ 6 M con Tris 0,1 M (ajusta el pH 8,0-8,5) y se hizo reaccionar con reactivos de PEG.

[0249] Los ejemplos específicos de compuestos sintetizados por los métodos descritos anteriormente se proporcionan a continuación:

50 Preparación de Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH

[0250] Se disolvieron 0,92 g de ácido L-homocisteico (5 mmol) (Sigma, St. Louis, MO) y 0,5 g (12,5 mmol) de NaOH en 50 ml de agua enfriada en baño de hielo. Se añadió en una vez una solución de carbonato de 9-fluorenilmetil succinimidilo (Fmoc-OSu) (1,86 g, 5,5 mmol) en 50 ml de dioxano. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante más de 4 h. La mezcla se evaporó a presión reducida y se añadieron 100 ml de agua. La solución acuosa se lavó con éter y a continuación se pasó a través de una columna de intercambio iónico (Amberlita IR-120B, forma H⁺; GFS Chemicals, Columbus, OH)). El eluato acuoso se liofilizó para producir Fmoc-homoCys(SO₃H)OH (1,6 g, 3,95 mmol, rendimiento 79,2%) amorfo viscoso. Al ácido libre anterior se le añadieron a continuación 50 ml de agua que contenía 0,16 g (4 mmol) NaOH en baño de hielo y se liofilizó para obtener Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH cuantitativo que se puede utilizar directamente en SPPS sin purificación adicional. El Fmoc-homoCys(SO₃Na)-OH liofilizado amorfo se recrystaliza en etanol/éster de acetato (2:1) para producir un producto sólido cristalino con un p.f. de 215-218°C y ESI-MS 404,2 [(M-H)⁺, forma ácida].

Síntesis de [PLA6, E9] glucagón (6-29) amida

[0251] Se sintetizó en primer lugar en fase sólida una secuencia de péptido TSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 51; [E3]glucagón (7-29)) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A usando 0,1 mmol del programa de química Fmoc/HOBT/DCC con 0,1 mmol de resina de amida Rink MBHA usando DIC/HOBT como reactivo de acoplamiento. Se utilizaron los siguientes aminoácidos de Fmoc: Ala, Arg(Pmc), Asp(OtBu), Asn(Trt), Glu(OtBu), Gln(Trt), Leu, Lys(Boc), Met, PLA, Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu), y Val. Después de la síntesis automatizada, la resina de peptidilo se acopló manualmente con ácido 3-fenil-láctico (83 mg, 0,5 mmol) y DEPBT (150 mg, 0,5 mmol) en 4 ml de DIEA al 5%/DMF durante aproximadamente 2 horas para obtener la resina de peptidilo con la siguiente secuencia: HO-PLA-Thr-Ser-Glu-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr NH₂ (SEQ ID NO: 50).

[0252] La resina de peptidilo se trató con 8,5 ml de TFA con la adición de 0,5 g de fenol, 0,5 ml de agua y 0,5 ml de tioanisol a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. El péptido disuelto en TFA se filtró y se añadieron 40 ml de éter para precipitar el péptido. El péptido en bruto se centrifugó, se disolvió en ácido acético acuoso y se liofilizó. El rendimiento del péptido en bruto fue de 200 ~ 250 mg y después de la purificación, el rendimiento fue de 25 ~ 40 mg (10-15% de rendimiento total) de péptido con un 95% de pureza. El péptido se analizó en HPLC analítica general mostrando un tiempo de retención de 7,66 min y el análisis ESI-MS mostró la masa deseada de 2986,0 que se corresponde con el péptido de peso molecular 2986,3.

[0253] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar el péptido [PLA6, D9] glucagón (6-29) amida con 7,25 min por HPLC analítica y 2973,5 por ESI-MS correspondientes al PM calculado 2973,3; [PLA6, D9, D28] glucagón (6-29) amida con 7,46min por HPLC analítica y PM de 2973,0 por ESI-MS correspondientes al 2973,3 calculado; [PLA6, C8, E9] glucagón (6-29) amida con 7,20 min por HPLC analítica y PM de 3002,0 por ESI-MS correspondientes al 3002,3 calculado; [PLA6, E9, C16] glucagón (6-29) amida con 7,38 min por HPLC analítica y PM de 3002,0 por ESI-MS correspondientes al 3002,3 calculado; [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida con 7,33 min por HPLC analítica y PM de 2961,0 por ESI-MS correspondientes al 2961,3 calculado; [PLA6, D9, C24] glucagón (6-29) amida con 7,43 min por HPLC analítica y PM de 2947,0 por ESI-MS correspondientes al 2947,3 calculado; [PLA6, E9, C40] glucagón (6-40) amida con 7,28 min por HPLC analítica y PM de 3925,5 por MALDI-MS correspondientes al 3924,3 calculado.

Síntesis de [hCys(SO₃H)9] glucagón (6-29) amida

[0254] Se sintetizó en primer lugar en fase sólida una secuencia de péptido YSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 51; glucagón (10-29)) en un sintetizador de péptidos automatizado ABI 433A usando 0,1 mmol del programa de química Fmoc/HOBT/DCC con 0,1 mmol de resina de amida Rink MBHA usando DIC/HOBT como reactivo de acoplamiento. Después de la síntesis automatizada, la resina de peptidilo se acopló manualmente con Fmoc-homoCys (SO₃Na)-OH (130 mg, 0,3 mmol), HOBT (45,2 mg, 0,33 mol) y DIC (52,0 µl, 0,33 mol) en 4 ml de DMF durante aproximadamente 2 horas. Después de la prueba de la ninhidrina, la mitad de la resina de peptidilo (0,05 mmol) se ensambló adicionalmente automáticamente con los 3 aminoácidos restantes Ser, Thr y Phe para obtener la resina de peptidilo con la siguiente secuencia: H₂N-Phe-Thr-Ser-homoCys(SO₃H)-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 52).

[0255] Se utilizaron los siguientes aminoácidos de Fmoc: Ala, Arg(Pmc), Asp(OtBu), Asn(Trt), Gln(Trt), homoCys(SO₃Na), Leu, Lys(Boc), Met, Phe, Ser(tBu), Thr(tBu), Trp(Boc), Tyr(tBu), y Val.

[0256] La resina de peptidilo se trató con 8,5 ml de TFA con la adición de 0,5 g de fenol, 0,5 ml de agua y 0,5 ml de tioanisol a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas. El péptido disuelto en TFA se filtró y se añadieron 40 ml de éter para precipitar el péptido. Los péptidos en bruto se centrifugaron, se disolvieron en ácido acético acuoso y se liofilizaron. El rendimiento de los péptidos en bruto fue de 100 ~ 130 mg y después de la purificación, el rendimiento fue de 15 ~ 20 mg (10-15% de rendimiento total) de péptido con un 95% de pureza. El péptido se analizó en HPLC analítica general mostrando un tiempo de retención de 6,73 min y el análisis ESI-MS mostró la masa deseada de 3021,0 que se corresponde con el péptido de peso molecular 3021,3.

[0257] Se realizó un procedimiento similar para sintetizar la [hCys(SO₃H)9] glucagón (5-29) amida con un tiempo de retención por HPLC analítica de 6,82 min y 3122,5 por ESI-MS correspondientes al PM calculado 3122,4; [hCys(SO₃H)9] glucagón (4-29) amida con un tiempo de retención por HPLC analítica de 6,83min y 3178,5 por ESI-MS correspondientes al PM calculado 3179,3; [hCys(SO₃H)9] glucagón (2-29) amida con un tiempo de retención por HPLC analítica de 6,79 min y 3394,5 por ESI-MS correspondientes al PM calculado 3394,7; [PLA6, hCys(SO₃H)9] glucagón (6-29) amida con un tiempo de retención por HPLC analítica de 7,17min y 3022,0 por ESI-MS correspondientes al PM calculado 3022,3.

Síntesis de [PLA6, E9, C24 (1,2K)] glucagón (6-29) amida

[0258] Se disolvieron 20 mg (0,00675 mmol) de [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida y 12,5 mg (0,01 mmol) de m-dPEGTM24-Mal (PM 1239, Quanta biodesign Ltd. Powell, OH) en 9 ml de acetonitrilo al 25% en agua y 1 ml de tampón base de Tris 1 M (ajustar el pH a 8,0-8,5). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitorizó mediante HPLC analítica. Después de no detectar producto inicial por HPLC (aproximadamente después de 2 horas), la mezcla de reacción se purificó directamente mediante HPLC preparativa.

[0259] Después de liofilizar, se obtuvieron aproximadamente 10 ~ 12 mg de [PLA6, E9, C24 (1,2K)] glucagón (6-29) amida cuyo análisis por HPLC analítica mostró un tiempo de retención de 7,48 min y ESI-MS 4.218,5 correspondientes al [M + H₂O] 4218,0.

[0260] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar el [C5 (1,2K), E9 glucagón (5-29) amida cuyo análisis por HPLC analítica mostró un tiempo de retención de 7,25 min y ESI-MS 4327,5 correspondientes al PM calculado 4327,8; [C8 (1,2K), E9] glucagón (6-29) amida cuyo análisis por HPLC analítica mostró un tiempo de retención de 7,25 min y ESI-MS 4260,0 correspondientes al [M + H₂O] 4259,0 calculado.

Síntesis de [PLA6, E9, C24 (20K)] glucagón (6-29) amida

[0261] Se disolvieron 15 mg (0,005 mmol) de [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida y 140 mg (0,006 mmol) de 20K mPEG-MAL (PM ~ 22k, Nektar, Huntsville, AL) en 9 ml de acetonitrilo al 25% en agua y 1ml de tampón de base Tris 1 M (ajustar el pH a 8,0-8,5). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitorizó mediante HPLC analítica. Después de no detectar producto inicial por HPLC (aproximadamente después de 6 horas), la mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC preparativa. Las fracciones se comprobaron mediante HPLC analítica a 214 nm y también se midieron mediante UV a 280 nm. Las fracciones con 90% de pureza HPLC y también con alta absorción (A₂₈₀ nm = 1,0-2,0) en la medición de UV se combinaron y liofilizaron. Se pueden obtener aproximadamente 60-80 mg de [PLA6, E9, C24 (20K)] glucagón (6-29) amida, cuyo análisis por HPLC analítica mostró un tiempo de retención de 8,5 a 8,6 min y MALDI-MS mostró una espectrometría de masas amplia en 24K-26K.

[0262] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar [PLA6, C8 (20K), E9] glucagón (6-29) amida, [PLA6, E9, C16 (20K)] glucagón (6-29) amida, [PLA6, E9, C40 (20K)] glucagón (6-40) amida, [PLA6, D9, C16 (20K)] glucagón (6-29) amida y [PLA6, D9, C24 (20K)] glucagón (6-29) amida.

Síntesis de [PLA6, E9, C24 (40K)] glucagón (6-29) amida

[0263] Se disolvieron 15 mg (0,005 mmol) de [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida y 240 mg (0,006 mmol) de 40K mPEG-MAL (PM ~ 40k, Chirotech Technology Ltd., Cambs CB4 OWG, Alemania) en 18 ml de acetonitrilo al 25% en agua y 2 ml de tampón de base Tris 1 M (ajustar el pH a 8,0-8,5). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitorizó mediante HPLC analítica. Después de no detectar producto inicial por HPLC (aproximadamente después de 6 horas), la mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC preparativa. Las fracciones se comprobaron mediante HPLC analítica a 214 nm y también se midieron mediante UV a 280 nm. Las fracciones con 90% de pureza HPLC y también con alta absorción (A₂₈₀ nm = 1,0-2,0) en la medición de UV se combinaron y liofilizaron. Se pueden obtener aproximadamente 100-120 mg de [PLA6, E9, C24 (40K)] glucagón (6-29) amida, cuyo análisis por HPLC analítica mostró un tiempo de retención de 8,60 a 8,8 min.

[0264] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar [PLA6, C8 (40K), E9] glucagón (6-29) amida, [PLA6, E9, C16 (40K)] glucagón (6-29) amida y [PLA6, E9, C40 (40K)] glucagón (6-40) amida, [PLA6, D9, C16 (40K)] glucagón (6-29) amida y [PLA6, D9, C24 (40K)] glucagón (6-29) amida.

Síntesis de Dímere [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida

[0265] Se disolvieron 20 mg (0,00675 mmol) de [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida en 6 ml de tampón PBS, 1 ml de tampón de base Tris 1 M (ajustar el pH a 8,0-8,5) y 3 ml de DMSO. La mezcla de reacción se agitó en un recipiente al aire libre y se monitorizó mediante HPLC analítica cada 2 horas. Después de que el producto inicial (HPLC RT 7,4 min) había desaparecido y el producto dímero (HPLC RT 7,9 min) era el producto dominante (después de 12 horas), la mezcla se diluyó con TFA al 0,1% y acetonitrilo al 10% en agua y se purificó directamente mediante HPLC preparativa. Después de liofilizar, se obtuvieron aproximadamente 6-8 mg de dímero [PLA6, E9, C24] glucagón (6-29) amida con ESI-MS 5920,0 correspondiente al PM calculado 5920,6.

[0266] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar el dímero [C9] glucagón (6-29) amida con ESI-MS 5916,0 correspondiente al PM calculado 5916,6 y el dímero [C5, E9] glucagón (5-29) amida con ESI-MS 6174,0 correspondiente al PM calculado 6174,8.

EJEMPLO 16

Actividades antagonistas de los análogos de glucagón

[0267] Se compararon la unión al receptor, la inducción de cAMP y la inhibición de cAMP de glucagón y varios inhibidores derivados de glucagón. Los ensayos para medir la unión al receptor y la inducción de cAMP y la inhibición de AMPc se realizaron utilizando el sistema de ensayo esencialmente tal como se describe en los ejemplos 12 y 13, respectivamente.

[0268] Se han preparado análogos específicos de glucagón que muestran actividad antagonista. Dichos compuestos difieren de glucagón nativo en que no poseen los residuos N-terminales nativos y tienen una sustitución de ácido glutámico en la posición 9 con respecto al glucagón nativo. La tabla 4 proporciona la afinidad por el receptor de glucagón y la actividad antagonista de varios antagonistas de análogos de glucagón específicos.

Tabla 4

Análogos de glucagón N-truncados modificados con ácido glutámico y sus actividades de antagonismo de glucagón		
Péptido	Unión a receptor	Inhibición de cAMP
	IC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
Glucagón	1-2,5	N/A
[Glu ⁹]Glucagon (aa2-29)-NH ₂	14	antagonista parcial
[Glu ⁹]Glucagon (aa2-29)-NH ₂	136	128
[Glu ⁹]Glucagon (aa2-29)-NH ₂	37	74
[Glu ⁹]Glucagon (aa2-29)-NH ₂	36	97
Glu ⁹ es ácido glutámico en la posición 9 según la numeración del glucagón nativo		

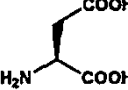
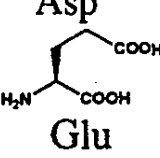
[0269] Tal como indican los datos de la Tabla 5, un conjunto de antagonistas basados en hCys9 no actúan de forma tan potente o selectiva como los antagonistas basados en Glu9 indicados previamente. Los compuestos 5B y 6B muestran un cierto nivel de antagonismo, pero sólo a concentraciones que son tres veces mayores que su dosis eficaz como agonista. Sin embargo, cuando se eliminan los aminoácidos N-terminales (además del aminoácido en la posición 1 del glucagón nativo), aumenta la potencia de los antagonistas de glucagón basados en hCys9 (ver tabla 8).

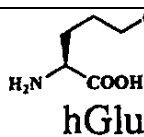
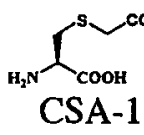
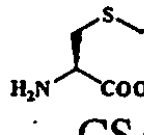
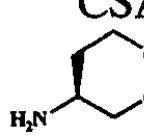
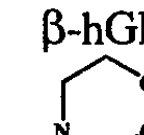
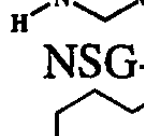
Tabla 5

Unión a receptor e inhibición de cAMP por análogos de antagonista				
Compuesto	Péptido	Unión a receptor IC ₅₀ (nM)	Inducción de cAMP EC ₅₀ (nM)	Inhibición de cAMP IC ₅₀ (nM)
	Glucagón	1,75 ± 0,31	0,21 ± 0,11	N/A
	[desHis ¹ , Glu ⁹]Glucagon-NH ₂	36,90 ± 0,32	65 ± 37	1862 ± 1234
	[desHis ¹ , Glu ⁹ , Phe ²⁵ , Leu ²⁷] Glucagon-NH ₂	12,59 ± 0,41	81 ± 23	N/A*
5	[desHis ¹ , desPhe ⁶]Glucagon-NH ₂	129,55 ± 44,9	1178 ± 105	N/A*
6	[desHis ¹ , Leu ⁴ , Glu ⁹]Glucagon-NH ₂	36,88 ± 0,03	318 ± 112	102 ± 52
4B	[desHis ¹ , hCys ⁹ (SO ₃ -), Phe ²⁵ , Leu ²⁷] Glucagon-NH ₂	13,90 ± 0,37	430 ± 45	N/A*
5B	[desHis ¹ , desPhe ⁶ , hCys ⁹ (SO ₃ -), Phe ²⁵ , Leu ²⁷] Glucagon-NH ₂	53,32 ± 9,97	3212 ± 368	9217 ± 3176
6B	[desHis ¹ , Leu ⁴ , hCys ⁹ (SO ₃ -), Phe ²⁵ , Leu ²⁷] Glucagon-NH ₂		1614 ± 1132	4456 ± 1469
*No es un antagonista las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice				

[0270] Se analizó la afinidad de unión al receptor de glucagón del glucagón y péptidos de glucagón modificados mediante truncamiento del primer aminoácido y mediante la sustitución en la posición 9 de unión (según la numeración de aminoácidos del glucagón nativo) esencialmente tal como se describe en el ejemplo 12. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6

Péptido no.	Péptido	residuo 9	IC ₅₀ (nM) ^a
	Glucagón		1,50 (1,0 ~ 2,5)*
1	[desHis ¹ , Glu ⁹]Glucagon-NH ₂		14,08 ± 0,34

2	[hGlu ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂		8,10 ± 0,40
3	[(CSA-1) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂		12,66 ± 0,13
4	[(CSA-2) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂		13,28 ± 0,78
5	[β-hGlu ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂		37,10 ± 0,34
6	[(NSG-1) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂		983 ± 82
7	[(NSG-2) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂		2348 ± 382

*EC50 (nM)

hGlu = ácido homoglutámico

las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice

[0271] Varios de los péptidos basados en glucagón modificado probados, incluyendo los péptidos modificados en la posición 9 con Glu, hGlu, CSA-I, CSA-2, y β-hGlu, mostraron una potente actividad antagonista de glucagón.

- 5 **[0272]** Se analizaron los péptidos de glucagón que comprenden un aminoácido modificado en la posición 9 y que tienen diferentes grados de truncamiento N-terminal para la actividad antagonista del glucagón. Los resultados de los péptidos probados se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

10

péptido no.	péptido	residuo 9	IC50 (nM) ^a	cAMP	
				pA ₂ ^b	(I/A) ₅₀ ^c
8	[Glu ⁹]Glucagón (aa4-29)-NH ₂	Glu	136,0 ± 17,84	7,05 ± 1,01	1375
9	[Leu ⁴ , Glu ⁹]Glucagón (aa4-29)-NH ₂	Glu	36,38 ± 8,69	NA ^d	NA
10	[Glu ⁹]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	Glu	37,38 ± 3,41	6,94 ± 0,34	390
11	[Glu ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	Glu	36,35 ± 5,23	7,16 ± 0,27	486
12	[hGlu ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	hGlu	162,9 ± 70,8	6,27 ± 0,11	2361
13	[(CSA-1) ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	CSA-1	107,3 ± 5,37	6,68 ± 1,05	506
14	[(CSA-2) ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	CSA-2	146,4 ± 36,9	6,64 ± 0,29	580

15	Glucagón (aa6-29)-NH ₂	Asp	1894 ± 383	6,94 ± 0,63	1730
16	[Lys ⁹] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	Lys	5779 ± 1382	6,58 ± 0,60	1990
17	[Glu ⁹]Glucagón (aa7-29)-NH ₂	Glu	>10000	ND ^e	ND

las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice

^a Los datos son promedio ± STD para al menos tres experimentos independientes

^bpA₂, el logaritmo negativo de la concentración del antagonista que reduce la respuesta hasta 1 unidad del agonista con respecto a la respuesta obtenida de 0,5 unidades de agonista. Los datos son promedio ± STD para al menos dos experimentos duplicados.

^c (I/A)₅₀, el índice de inhibición, la proporción de la IC₅₀ del inhibidor con respecto a glucagón constante añadido (0,1-0,2 nM). Los datos son el promedio de al menos tres experimentos independientes y normalizados mediante la EC₅₀

^dNA, antagonista no completo. ^e ND, no detectado

[0273] La figura 3 presenta los datos de medición de la afinidad de unión de los antagonistas de glucagón, en los que el extremo N-terminal se acortó adicionalmente con la eliminación de uno, tres o cinco aminoácidos. Más particularmente, se investigó la afinidad de unión de los antagonistas de glucagón basados en hCys9 mediante medidas basadas en su capacidad para competir con glucagón marcado con ¹²⁵I en la unión al receptor de glucagón. Los resultados demuestran que la eliminación del primer residuo reduce la afinidad, pero la eliminación adicional cambia la afinidad sólo ligeramente produciendo aún un ligando de afinidad nanomolar. La figura 4 presenta datos que demuestran la capacidad de los antagonistas seleccionados para suprimir la acción del glucagón en un bioensayo de cAMP. Sorprendentemente, se observó que el antagonista de glucagón basado en 5-29 hCys9 era más potente y eficaz que los estándares de la literatura de Glu9 2-29, o Leu4, Glu9 4-29. Además, los análogos 5-29 o 6-29 hCys9 han mostrado un potente antagonismo puro, sin ninguna actividad agonista medible.

[0274] La tabla 8 proporciona la afinidad por el receptor de glucagón y la actividad antagonista para varios análogos de fragmentos de glucagón truncados modificados con ácido homocisteico. El antagonista basado en hCys(SO₃H)⁹ basado en desHis1 actúa de forma tan potente como los péptidos [desHis¹, Glu⁹] glucagón antagonistas basados en Glu⁹ indicados previamente. Se estudiaron los antagonistas de glucagón basados en hCys(SO₃H)⁹ más acortados con la eliminación de tres, cuatro o cinco aminoácidos. Los resultados de la unión al receptor demuestran que la eliminación del primer residuo reduce la afinidad del compuesto por el receptor de glucagón, pero la eliminación adicional cambia la afinidad sólo ligeramente, y produce aún un ligando de afinidad nanomolar.

Tabla 8: Análogos de fragmentos de glucagón truncados modificados con ácido homocisteico y sus actividades de antagonismo de glucagón

Péptido	IC ₅₀ (nM)	cAMP	
		pA ₂	IC ₅₀ (nM)
Glucagón	1,0-2,5 (EC50)		
[desHis ¹ , Glu ⁹]glucagón-NH ₂	14,08 ± 0,34	NA	1089 (antagonista parcial)
[hCys ⁹ (SO ₃ H)]glucagón (aa2-29)-NH ₂	13,16 ± 1,0	NA	146,6 (antagonista parcial)
[hCys ⁹ (SO ₃ H)] glucagón (aa4-29)	41,55 ± 4,79	7,22 ± 1,09	68,4
[hCys ⁹ (SO ₃ H)] glucagón (aa5-29)	33,85 ± 9,38	6,77 ± 0,33	98,3
[hCys ⁹ (SO ₃ H)] glucagón (aa6-29)	59,11 ± 18,10	7,16 ± 0,51	133,4

las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice

[0275] Tal como se muestra en los datos presentados en las figuras 5A y 5B, los péptidos basados en 4-29, 5-29 y 6-29 hCys(SO₃H)⁹ son sorprendentemente todos antagonistas completos de la acción del glucagón, mientras que los péptidos 2-29 eran mucho menos eficaces en la supresión total de la actividad de glucagón. La figura 5A demuestra que la incapacidad de los péptidos 2-29 para suprimir completamente la acción del glucagón es función de la agonismo residual del glucagón que cada uno de estos dos péptidos mantiene.

[0276] También se han desarrollado análogos específicos de glucagón en los que la fenilalanina que aparece normalmente en la posición seis ha sido sustituido por ácido fenil-láctico (PLA), en un esqueleto de glucagón amida acortada 6-29. El PLA es isoelectrónico con la fenilalanina (Phe), pero no tiene un hidrógeno valorable. Los datos presentados en las Tablas 9 y 10 demuestran que con la sustitución de PLA6, el análogo Asp9 nativo muestra antagonismo puro, pero la potencia se reduce en relación a la de los análogos Glu9 y hCys(SO₃H)⁹. La literatura ha indicado anteriormente que el residuo Asp9 nativo tiene que cambiarse a Glu9 o hCys(SO₃H)⁹ para una alta afinidad y potente antagonismo de los análogos de glucagón (2-29). Por consiguiente, es sorprendente que la sustitución de Phe

por PLA en un esqueleto de glucagón amida acortado 6-29 mejora la potencia antagonista relativa del análogo a un punto comparable a la de los análogos Glu9 y hCys(SO₃H)⁹. Más específicamente, el análogo PLA6 aumenta la afinidad del análogo por el receptor de glucagón en tres veces, así como la potencia de antagonismo con respecto al análogo Phe6 nativo.

5

Tabla 9: Análogos de glucagón sustituidos en el residuo 9 (6-29) y sus actividades de antagonismo de glucagón

Péptido	Residuo 9	IC ₅₀ (nM) unión al receptor	cAMP pA ₂	IC ₅₀ (nM)
Glucagón	Asp	1,0-2,5		0,05-0,15 (EC ₅₀)
[E ⁹]glucagón(aa 6-29)-NH ₂	Glu	36,35 ± 5,23	7,16 ± 0,27	97,2
[HCys(SO ₃) ⁹]glucagón (aa 6-29)-NH ₂	hCys(SO ₃)	59,11 ± 18,10	7,16 ± 0,51	133,4
[hE ⁹]glucagón(aa 6-29)-NH ₂	hGlu	162,9 ± 70,8	6,27 ± 0,11	472,2
[C ⁹ (SCH ₂ COOH)]glucagón (aa 6-29)-NH ₂	CSA-1	107,3 ± 5,37	6,68 ± 1,05	101,2
[C ⁹ (SCH ₂ CH ₂ COOH)]glucagón (aa 6-29)-NH ₂	CSA-2	146,4 ± 36,9	6,64 ± 0,29	116
Glucagón (aa 6-29)-NH ₂	Asp	1670 ± --	6,94 ± 0,63	346
[K ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	Lys	3236 ± --	6,58 ± 0,60	398

las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice

Tabla 10: Análogos [PLA6]glucagón sustituidos en el residuo 9 y sus actividades de antagonismo de glucagón

Péptido	IC ₅₀ (nM) (unión al receptor)	IC ₅₀ (nM) (cAMP, inhibición de glucagón) 0,1 nM o 0,2 nM	Solubilidad (%; pH 6-8)
Glucagón	1,96 ± 0,61	0,09 (EC ₅₀)	
[PLA6, D9]Glucagón (aa 6-29)-NH ₂	13,85 ± 3,22	6,90	11
[PLA6, D9]Glucagón (aa 6-29)-COOH	15,51 ± 3,86	13,20	96
[PLA6, E9]Glucagón (aa 6-29)-NH ₂	12,33 ± 2,24	2,39	42,40
[PLA6, hCys(SO ₃) ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	14,20 ± 0,45	40,20	
[PLA6, D9, D28]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	9,0 ± 1,24	1,32	100
[PLA6, E9]Glucagón (aa6-29 + CEX)-NH ₂	40,28 ± 11,29	24,75	16

las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice

10 [0277] También se investigó el efecto de la sustitución de PLA en diferentes posiciones del análogo de glucagón, incluyendo en las posiciones 4 y 5. Los datos presentados en la Tabla 11 y en la figura 8 demuestran que el análogo PLA6 es un antagonista apreciablemente más potente que los péptidos ligeramente alargados. Los resultados presentados en la figura 8 también demuestran que la acilación del grupo hidroxilo no afecta a la potencia del análogo PLA6.

15

Tabla 11: Análogos con sustitución de PLA en las posiciones 4, 5 y 6 y sus actividades de antagonismo de glucagón

Péptido	IC ₅₀ (nM) (unión al receptor)	IC ₅₀ (nM) (cAMP, inhibición de glucagón 0,8 mM)
Glucagón	1,0-2,5	1,44 (EC ₅₀ +))
[PLA ⁶ , E ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	12,34 ± 0,13	64,8 ± 3,4
[Ac-PLA ⁶ , E ⁹]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	ND	38,1 ± 9,2
[PLA ⁵ , E ⁹]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	ND	328 ± 25
[PLA ⁴ , E ⁹]Glucagón (aa4-29)-NH ₂	ND	84,4 ± 19,5 (agonista parcial)

ND: no detectado

las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por números en superíndice

20 [0278] Los datos presentados en la Tabla 12 demuestran que la sustitución PLA6 no sólo aumenta la potencia del péptido, sino que también tiene un papel crítico en la pegilación. Los análogos PLA6 pueden ser pegilarse

selectivamente sin la restauración del agonismo del glucagón. Los análogos Phe6 nativos sorprendentemente demuestran una restauración del agonismo cuando se pegan. Sin embargo, esta restauración del agonismo no se observa en los análogos peptídicos PLA6. Se examinaron varios sitios de pegilación específicos, incluyendo las posiciones de aminoácido 8, 11 y 24 (en relación con el péptido de glucagón nativo). La pegilación en la posición 24 del análogo PLA6 muestra el antagonismo de glucagón más potente y selectivo.

Tabla 12: Análogos de glucagón truncados en N-terminal PEGilados y sus actividades de antagonismo del glucagón

Péptido	IC ₅₀ (nM) (unión al receptor)	IC ₅₀ (nM) (cAMP, inhibición de glucagón 0,2 mM)
[C8 (20 kDa PEG), E9]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	> 1000	sin antagonismo
[PLA6, C8 (20 kDa PEG), E9]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	303 ± 14	236
[E9, C11 (20 kDa PEG)]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	> 1000	sin antagonismo
[PLA6, E9, C11 (20 kDa PEG)]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	776 ± 161	664
[E9, C24 (20 kDa PEG)]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	> 1000	sin antagonismo
[PLA6, E9, C24 (20 kDa PEG)]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	90 ± 7	126
[MCA6, E9, C24 (20 kDa PEG)]Glucagón (aa6-29)-NH ₂	208 ± 57	sin antagonismo
[C5 (1,2 kDa PEG), E9]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	1081 ± 268	2281
[C5 (5 kDa PEG), E9]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	634 ± 174	1608
[C5 (20 kDa PEG), E9]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	331 ± 74	976
[d-Cys5 (20 kDa PEG), E9]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	> 10000	14764
[K5(CH ₂ CH ₂ S-20 kDa PEG), E9]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	> 10000	sin antagonismo
3,4 kDaPEG-dímero [C5, E9]Glucagón (aa5-29)-NH ₂	435 ± 256	1343
[PLA6, C8 (1,2 kDa PEG),E9] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	220 ± 36	sin antagonismo
[PLA6, C8 (5 kDa PEG),E9] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	948 ± 297	216
[PLA6, C8 (20 kDa PEG),E9] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	303 ± 14	92
[PLA6, E9, C24 (1,2 kDa PEG)] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	4,7 ± 0,4	18
[PLA6, E9, C24 (20 kDa PEG)] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	90 ± 7	126
[MCA6, E9, C24 (20 kDa PEG)] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	208 ± 57	sin antagonismo
[Phe6, E9, C24 (20 kDa PEG)] Glucagón (aa6-29)-NH ₂	> 10000	sin antagonismo

10 EJEMPLO 17

[0279] Los antagonistas de glucagón descritos en este documento se acilan de la siguiente manera: Los péptidos acilados y/o PEGilados se preparan de la siguiente manera. Los péptidos se sintetizan en una resina de soporte sólido utilizando un sintetizador de péptidos CS Bio 4886 o un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A. Se utiliza química de neutralización in situ tal como se describe por Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). Para los péptidos acilados, el residuo de aminoácido diano a acilar (por ejemplo, la posición diez) se sustituye por un residuo de N ε-Fmoc lisina. El tratamiento del péptido protegido N-terminalmente con BOC completado con piperidina al 20% en DMF durante 30 minutos elimina los grupos FMOC/formilo. El acoplamiento al residuo de Lys con el ε-amino libre se logra mediante el acoplamiento de un exceso molar de diez veces de un aminoácido espaciador protegido con FMOC (por ejemplo, FMOC-(N-BOC)-triptófano-OH) o la cadena de acilo (por ejemplo, C17-COOH) y el reactivo de acoplamiento PyBOP o DEPBT en DMF/DIEA. La eliminación posterior del grupo Fmoc del aminoácido espaciador va seguida por la repetición del acoplamiento con una cadena de acilo. El tratamiento final con 100% de TFA da lugar a la eliminación de cualquier grupo protector de la cadena lateral y el grupo BOC N-terminal. Las resinas de

péptidos se neutralizan con DIEA al 5%/DMF, se secan, y a continuación se separan del soporte utilizando HF/p-cresol, 95: 5, a 0°C durante una hora. Después de extracción con éter, se utiliza una solución de HOAc al 5% para solvatar el péptido en bruto. A continuación, se verifica una muestra de la solución para que contenga el péptido de peso molecular correcto mediante ESI-MS. Los péptidos correctos se purifican mediante RP-HPLC usando un gradiente lineal de CH₃CN al 10%/TFA al 0,1% a TFA al 0,1% en 100% de CH₃CN. Se utiliza una columna de proteínas Vydac C18 22 mm x 250 mm para la purificación. Los análogos de péptidos acilados completan generalmente la elución mediante una relación de tampón de 20:80. Las partes se agrupan y se comprueba la pureza en una RP-HPLC analítica. Las fracciones puras se liofilizan proporcionando péptidos sólidos blancos.

[0280] Para la pegilación de péptidos, se hace reaccionar metoxi poli(etilenglicol) maleimido propionamida de 40 kDa (Chiretech Technology Ltd.) con un equivalente molar de péptido en urea 7 M, tampón Tris-HCl 50 mM usando la cantidad mínima de disolvente necesaria para disolver el péptido y PEG en una solución transparente (por lo general menos de 2 ml para una reacción con 2-3 mg de péptido). La agitación vigorosa a temperatura ambiente se inicia durante 4-6 horas y la reacción se analiza mediante RP-HPLC analítica. Los productos PEGilados aparecen distintos al material de partida con tiempos de retención disminuidos. La purificación se realiza en una columna Vydac C4 con condiciones similares a las utilizadas para la purificación inicial de péptidos. La elución tiene lugar alrededor de las relaciones de tampón de 50:50. Se encuentran las fracciones de péptido PEGilado puro y se liofilizan.

EJEMPLO 18

[0281] La síntesis de depsipéptidos basados en glucagón [Thr5-O-PLA6, E9] glucagón (2-29) amida y [Thr5-O-PLA6, E9] glucagón (1-29) amida se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se sintetizó una secuencia de péptido HO-PLA-TSEYSKYLSRRAQDFVQWLMNT [PLA6, E9] glucagón (6-29) (SEQ ID NO: 71) mediante química Boc en fase sólida usando un sintetizador de péptidos automatizado ABI 430A con 0,2 mmol de resina de amida MBHA y DEPBT como reactivo de acoplamiento. Se utilizaron los siguientes aminoácidos Boc: Ala, Arg(Tos), Asp(OcHx), Asn(Xan), Glu(OcHx), Gln(Xan), Leu, Lys(2-Cl-Z), Met, PLA, Ser(OBzl), Thr(OBzl), Trp(HOC), Tyr(2,6-di-Cl-Bzl), y Val. Para este péptido se formó un depsi-péptido (enlace éster) en la resina mediante el acoplamiento manual con una solución de anhídrido simétrico preactivado compuesto de Boc-Thr(OBzl)-OH (2 mmol)/DIC (1 mmol)/DMAP (0,2 mmol) en DCM durante aproximadamente 16 h. Los restantes aminoácidos se acoplaron mediante química Boc estándar para obtener la resina de depsipeptidilo de la siguiente secuencia: Ser-Gln-Gly-Thr-O-PLA-Thr-Ser Glu-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 64).

[0282] La resina de peptidilo se trató con fluoruro de hidrógeno líquido para escindir el péptido en bruto del soporte sólido y eliminar todos los grupos protectores. El depsipéptido se purificó mediante HPLC preparativa, y se analizó mediante MS y HPLC analítica. El péptido purificado mostró un único pico en la cromatografía analítica y el análisis ESI-MS produjo la masa deseada de 3359,0 que se corresponde con el peso molecular calculado de 3359,6 daltons.

[0283] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar el depsipéptido [Thr5-O-PLA6, E9] glucagón (1-29) amida (SEQ ID NO: 65) con un acoplamiento de adición individual de un residuo de histidina N-terminal. El péptido purificado mostró un único pico en la cromatografía analítica y el análisis ESI-MS produjo la masa deseada de 3495,9 que se corresponde con el peso molecular calculado de 3496,8 daltons.

EJEMPLO 19

[0284] Los siguientes péptidos se sintetizaron tal como se describe en general anteriormente y posteriormente se probó la capacidad de estimular el receptor de GLP-1 mediante el ensayo de liberación de AMPc de las células que expresan el receptor de GLP-1 humano y la capacidad de estimular el receptor de glucagón mediante el ensayo de liberación de cAMP de las células que expresan el receptor de glucagón humano y se estimularon con glucagón 0,5 nM, tal como se describe en general en el Ejemplo 13. Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 13.

TABLA 13

Péptido	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
	IC ₅₀ (nM, inhiben glucagón 0,5 nM)	EC ₅₀ (nM)
Glucagón	0,005 ± 0,008	
GLP-1		0,005 ± 0,002
[PLA6, E9]Glucagón(6-29) <i>PLA</i> TSEYSKYLSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 71)	23,75 ± 4,16	Sin agonismo
[PLA6, D9, D28]Glucagón(6-29) <i>PLA</i> TSDYSKYLSRRAQDFVQWLMDT-NH ₂ (SEQ ID NO: 62)	9,03 ± 1,54	746,0 ± 225,7
[E9]Glucagón (2-29) SQGTFTSEYSKYLSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂	340,0 ± 149,0	2719,8 ± 2136,4

(SEQ ID NO: 63)		
[Thr5-O-PLA6, E9]Glucagon(2-29) SQGT(O*)FTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 64)	6,49 ± 2,17	1305,6 ± 241,5
[Thr5-O-PLA6, E9]Glucagon(1-29) HSQGT(O*)FTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 65)	14,19 ± 7,89	721,0 ± 35,5
(O*) representa un enlace depsipéptido		

LISTADO DE SECUENCIAS

5	[0285]	
	<110> DiMarchi, et al.	
10	<120> Antagonistas de glucagón	
	<130> 29920-79399 (31135/43853)	
15	<150> 60/983783	
	<151> 2000-01-01	
20	<160> 71	
	<170> PatentIn version 3.5	
25	<210> 1	
	<211> 29	
30	<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> 28	
45	<212> PRT	
	<213> Secuencia Artificial	
50	<220>	
	<223> Polipéptido Sintético	
55	<220>	
	<221> MISC_FEATURE	
60	<223> Análogo de glucagón	
	<220>	
65	<221> MISC_FEATURE	
	<222> (8)..(8)	
70	<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico	
	<400> 2	
75	Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg 1 5 10 15 Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr 20 25	
	<210> 3	
80	<211> 27	
	<212> PRT	
85	<213> Secuencia Artificial	

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

15 <400> 3
 Gln Gly Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg
 1 5 10 15
 Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 20 25

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

40 <400> 4
 Gly Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala
 1 5 10 15
 Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 45 20 25

<210> 5
 <211> 25
 <212> PRT
 50 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

65 <400> 5
 Thr Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln
 1 5 10 15

Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

5 <210> 6
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa en la posición 22 es Met, Leu o Nle

<400> 6

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

35 <210> 7
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 7

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

65 <210> 8
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

20 <400> 8
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
 20

25 <210> 9
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Arg

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

65 <400> 9
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr

20

5 <210> 10
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es is Lys o Arg

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

40 <400> 10

45 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
 20

50 <210> 11
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)

<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

5 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es Lys o Arg

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

20 <400> 11
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr
20

25 <210> 12
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Polipéptido Sintético

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo de glucagón

40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(7)
<223> Xaa es Lys o Arg

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(11)
<223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (19)..(19)
<223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 12

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
1 1 5 10 15
5 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr
20

<210> 13
<211> 24
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo de glucagón

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
homocisteico

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(11)
<223> Pegilado

35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

40 <400> 13

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

<210> 14
<211> 24
50 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Polipéptido Sintético

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo de glucagón

60 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)

<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Pegilado

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

15 <400> 14
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asn Thr
20

20 <210> 15
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Polipéptido Sintético

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo de glucagón

35 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Pegilado

55 <400> 15
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Cys
20

60 <210> 16
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

65 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico
 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 25 <400> 16
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 30 Phe Val Lys Trp Leu Xaa Asn Thr
 20
 <210> 17
 <211> 24
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Pegilado
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 65 <400> 17
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys Arg Arg Ala Gln Asp

1 Phe Val Cys Trp 5 Leu Xaa Asn Thr 10 15
20

5 <210> 18
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
15 <223> Análogo de glucagón

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
20 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
25 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

<220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
35 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 18

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

45 <210> 19
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
55 <223> Fragmento de péptido que representa los 10 aminoácidos carboxi
terminales de Exendina-4

<400> 19

60 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 8
65 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido Sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fragmento de péptido que representa los 8 aminoácidos carboxi terminales de oxintomodulina

10 <400> 20
 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 1 5

15 <210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fragmento de péptido que representa los 4 aminoácidos carboxilo del extremo carboxilo de oxintomodulina

30 <400> 21
 Lys Arg Asn Arg
 1

35 <210> 22
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Arg

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

60 <400> 22
 Phe Thr Ser Arg Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Thr
 20

65 <210> 23
 <211> 34
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 homocisteico
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Arg
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 30
 <400> 23
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa
 1 5 10 15
 35 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 Pro Ser
 <210> 24
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 55 homocisteico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 60 <223> Xaa es Lys o Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 65 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (19)..(19)
 <223> Pegilado

 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

 <400> 24
 10 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Ile Ala
 20 25 30
 15 <210> 25
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 homocisteico

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Arg

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado

 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

 <400> 25
 55 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 60 Pro Ser

 <210> 26
 <211> 32
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 10 homocisteico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 15 <223> Xaa es Lys o Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 20 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 25 <223> Pegylation
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 30 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 <400> 26
 35 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Ile Ala
 20 25 30
 <210> 27
 40 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 50
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 55 homocisteico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 60 <223> Xaa es Lys o Arg
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 65 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina
 <220>
 <221> MOD_RES

<222> (16)..(16)
 <223> Pegilado

 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

 <400> 27
 10 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Xaa
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg
 20 25
 15 <210> 28
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 homocisteico

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Arg

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado

 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

 <400> 28
 55 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg
 20 25
 60 <210> 29
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

20 <400> 29

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 25 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 Pro Ser

30 <210> 30
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 30

60 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 20 25 30

65 <210> 31
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

25 <400> 31
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Cys
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Lys Arg Asn Arg
 20 25

30 <210> 32
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

<400> 32

45 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

50 <210> 33
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

<400> 33

65 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

5 <210> 34
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> 2-butirolactona unida a través de grupo tiol de cisteína

20 <400> 34

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

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

35 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Grupo carboximetilo unido a través del grupo tiol de cisteína

45 <400> 35

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

50 <210> 36
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 10
 <400> 36
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 15 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
 20
 <210> 37
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 30
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 40
 <400> 37
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 45 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
 20
 <210> 38
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 60
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 65
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<400> 38

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Glu Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
5 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
20

<210> 39
<211> 24
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
15 <223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <223> Análogo de glucagón

<220>
<221> MISC_FEATURE
25 <222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>
30 <221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
35 <221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

<220>
40 <221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa es Asn, Asp, Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
45 <221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa es Thr, Asp, Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico

<400> 39

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
50 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
20

<210> 40
55 <211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
60 <223> Polipéptido Sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
65 <223> Análogo de glucagón

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 5 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido

<400> 40

30 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 41
 35 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 40 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <223> Análogo de glucagón

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 50 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 55 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 60 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 65 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Asp o Glu

 <220>
 5 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr, glu o Asp

 <400> 41
 10 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20
 15 <210> 42
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

 <220>
 30 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido

 <220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido

 <400> 42
 60 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20
 65 <210> 43
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 homocisteico
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido
 25 homocisteico
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 30 <223> Grupo PEG de 20kDa unido a Cys en la posición 11
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 35 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 40 <223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 45 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido
 <400> 43
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Cys Arg Arg Ala Gln Asp
 50 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20
 <210> 44
 55 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 65
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)

<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Grupo de PEG de 20kDa unido a Xaa en la posición 16

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido

<400> 44

Phe	Thr	Ser	Xaa	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Xaa	Ser	Arg	Arg	Ala	Gln	Cys
1				5					10					15	
Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Xaa	Xaa	Xaa								
			20												

<210> 45
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)

<223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (19)..(19)
<223> Pegilado

10 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
<223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido

25 <400> 45
Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
Phe Val Cys Trp Leu Xaa Xaa Xaa
20

30 <210> 46
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Polipéptido Sintético

40 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Análogo de glucagón

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (22)..(22)
<223> Xaa es Met, Leu o Nle

65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 5 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 10 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 15 <223> Pegilado

<400> 46

20 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro
 20 25 30
 Pro Pro Ser
 35

25 <210> 47
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 5 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 10 <223> Pegilado

<400> 47

15 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 Pro Ser Xaa
 35

20 <210> 48
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

<400> 48

35 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 Gly Pro Ser
 20 25 30
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 40 35

45 <210> 49
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Arg

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 5 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 10 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 15 <223> Pegilado

<400> 49

20 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 Pro Ser Xaa
 35

25 <210> 50
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<400> 50

45 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

50 <210> 51
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

<400> 51

65 Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp
 1 5 10 15
 Leu Met Asn Thr
 20

5 <210> 52
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido homocisteico

 20 <400> 52
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

 25 <210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 30 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fragmento de péptido que representa los 10 aminoácidos carboxi
 terminales de Exendina-4

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

 45 <400> 53
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa
 1 5 10

 50 <210> 54
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico

 <400> 54

 65 His Ser Gln Gly Thr Xaa
 1 5

 <210> 55

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 <400> 55
 15 Ser Gln Gly Thr Xaa
 1 5
 <210> 56
 <211> 4
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 30 <400> 56
 Gln Gly Thr Xaa
 1
 35 <210> 57
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 45 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 <400> 57
 50 Gly Thr Xaa
 1
 <210> 58
 55 <211> 2
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 60 <223> Polipéptido Sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 65 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 <400> 58

Thr Xaa
1

5 <210> 59
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Polipéptido Sintético

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en His, D-histidina, Ácido alfa, alfa-dimetil imidiazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hydroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina

20 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Ser, D-serina, D-alanina, Val, Gly, N-metil serina, N-metil alanina, y Ácido aminoisobutírico (AIB)

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Glu o Gln

30 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa es ácido fenil láctico

35 <400> 59

40 Xaa Xaa Xaa Gly Thr Xaa
1 5

45 <210> 60
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Polipéptido Sintético

55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(1)
<223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Ser, D-serina, D-alanina, Val, Gly, N-metil serina, N-metil alanina, y Ácido aminoisobutírico (AIB)

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (2)..(2)
<223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Glu o Gln

65 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (5)..(5)
<223> Xaa es ácido fenil láctico

<400> 60

Xaa Xaa Gly Thr Xaa
 1 5

5 <210> 61
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Glu y Gln

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico

<400> 61

25 Xaa Gly Thr Xaa
 1

<210> 62
 <211> 24
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido AL

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal opcionalmente sustituido por amida

50 <400> 62

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 55 20

<210> 63
 <211> 28
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Polipéptido Sintético

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido AM

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal opcionalmente sustituido por amida
 5 <400> 63
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
 1 5 10 15
 10 Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 64
 <211> 28
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido AN
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 <223> Treonina en la posición 4 y ácido fenil láctico en la posición 5
 Unidos a través de un enlace éster
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal opcionalmente sustituido por amida
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal opcionalmente sustituido por amida
 45 <400> 64
 Ser Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg
 1 5 10 15
 50 Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25
 <210> 65
 <211> 29
 55 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Polipéptido Sintético
 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido AO
 65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 <223> Treonina en la posición 5 y ácido fenil láctico en la posición 6

unidos a través de un enlace éster

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal opcionalmente sustituido por amida

 <400> 65
 15 His Ser Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Glu 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
 20 <210> 66
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 25 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido AQ

 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es ácido aminoisobutírico

 <400> 66
 45 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20
 50 <210> 67
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 55 <220>
 <223> Polipéptido Sintético

 60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Péptido AT

 65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

 <400> 67
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp

	1		5		10		15	
	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Met	Asn	Thr
			20					

5	<210>	68
	<211>	6
	<212>	PRT
	<213>	Secuencia Artificial

10	<220>	
	<223>	Polipéptido Sintético

	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
15	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa se selecciona del grupo que consiste en His, D-histidina, Ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina

20	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(2)
	<223>	Xaa se selecciona del grupo que consiste en Ser, D-serina, D-alanina, Val, Gly, N-metil serina, N-metil alanina, y Ácido aminoisobutírico (AIB)

25	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(3)..(3)
	<223>	Xaa se selecciona del grupo que consiste en Glu o Gln

	<400>	68
--	-------	----

35	Xaa	Xaa	Xaa	Thr	Gly	Phe
	1				5	

	<210>	69
	<211>	5
40	<212>	PRT
	<213>	Secuencia Artificial

	<220>	
	<223>	Polipéptido Sintético

45	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(1)..(1)
	<223>	Xaa se selecciona del grupo que consiste en Ser, D-serina, D-alanina, Val, Gly, N-metil serina, N-metil alanina, y ácido aminoisobutírico (AIB)

50	<220>	
	<221>	MISC_FEATURE
	<222>	(2)..(2)
	<223>	Xaa se selecciona del grupo que consiste en Glu o Gln

	<400>	69
--	-------	----

60	Xaa	Xaa	Thr	Gly	Phe
	1			5	

	<210>	70
	<211>	4
65	<212>	PRT
	<213>	Secuencia Artificial

	<220>	
--	-------	--

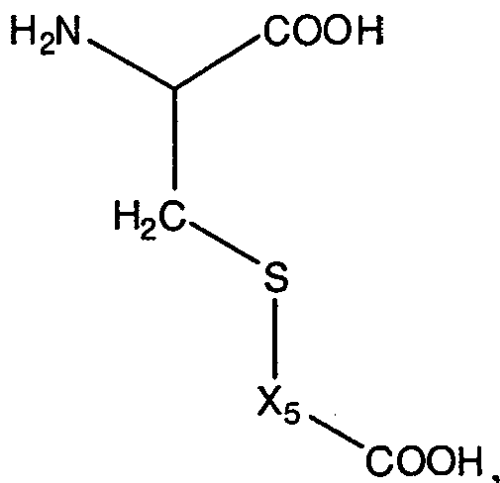
```

<223> Polipéptido Sintético
<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (1)..(1)
<223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Glu o Gln
<400> 70
10 Xaa Thr Gly Phe
1
<210> 71
<211> 24
15 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Polipéptido Sintético
20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
25 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (24)..(24)
30 <223> Alfa carboxilato C-terminal opcionalmente sustituido por amida
<400> 71
Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
1 5 10 15
35 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20

```

REIVINDICACIONES

1. Antagonista de glucagón que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42, o un derivado de la SEQ ID NO: 42 que difiere de la SEQ ID NO: 42 por sustituciones de aminoácidos en una a tres posiciones de aminoácidos seleccionadas entre las posiciones 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14 de la SEQ ID NO: 42, en la que el NH₂ N-terminal del antagonista de glucagón "o derivado" está sustituido por un grupo hidroxilo, de manera que la Phe en la posición 1 del antagonista de glucagón es ácido fenil láctico (PLA), y sales farmacéuticamente del mismo.
2. Antagonista de glucagón, según la reivindicación 1, en el que cuando el antagonista de glucagón comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 42:
- (i) el aminoácido terminal del antagonista de glucagón tiene un grupo amida en lugar del grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo,
 - (ii) el aminoácido en la posición 4 de la SEQ ID NO: 42 es ácido aspártico,
 - (iii) el antagonista de glucagón comprende además el aminoácido de la SEQ ID NO: 19 fusionado al aminoácido carboxi terminal de la SEQ ID NO: 42,
 - (iv) el antagonista de glucagón comprende además un grupo hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 11, 16 ó 19 de la SEQ ID NO: 42, y sales farmacéuticamente aceptables de dicho péptido de glucagón,
 - (v) el antagonista de glucagón comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 46 ó 47,
 - (vi) cuando el aminoácido en la posición 23 es Asn, el aminoácido en la posición 24 se selecciona del grupo que consiste en Asp o Glu, y, cuando el aminoácido en la posición 24 es Thr, el aminoácido en la posición 23 se selecciona del grupo que consiste en Asp o Glu (según la numeración de la SEQ ID NO: 42),
 - (vii) el antagonista de glucagón comprende además uno a dos aminoácidos añadidos al extremo carboxi terminal del antagonista de glucagón de la SEQ ID NO: 42, en el que dichos aminoácidos añadidos al extremo carboxi terminal se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp o Glu,
 - (viii) el aminoácido en la posición 10 de la SEQ ID NO: 42 se selecciona del grupo que consiste en Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico,
 - (ix) el antagonista de glucagón comprende la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 7, 8, 36, 37, 39, 40 y 41.
3. Antagonista de glucagón, según la reivindicación 1, en el que el grupo hidrófilo es una proteína plasmática o la parte Fc de una inmunoglobulina, o un polietilenglicol, o un polietilenglicol que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20.000 Daltons o un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.
4. Antagonista de glucagón, según la reivindicación 3, en el que el antagonista de glucagón tiene la secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOs: 9-12, 16-18 y 43-45.
5. Antagonista de glucagón que comprende la estructura general A-B-C, en la que
- A es ácido fenil láctico (PLA);
 - B representa los aminoácidos 7 a 26 de la SEQ ID NO: 1 que comprende una o más modificaciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en:
- (iv) Asp en la posición 9 (según la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1) está sustituido por Glu, un derivado de ácido sulfónico de Cys, ácido homoglutámico, ácido β-homoglutámico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄.

(v) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1) por un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida, o alquilamina;

(vi) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1) por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetil-fenilalanina (Ac-Phe), en la que el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un grupo hidrófilo;

(vii) Asp en la posición 15 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1) está sustituido por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(viii) Ser en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1) está sustituido por ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(ix) sustitución por AIB en una o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 según la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1;

y

C se selecciona del grupo que consiste en:

(x) X;

(xi) X-Y;

(xii) X-Y-Z; y

(xiii) X-Y-Z-R10,

en el que X es Met, Leu, o Nle; Y es Asn o un aminoácido cargado; Z es Thr, Gly, Cys, Lys, ornitina (Orn), homocisteína, acetil fenilalanina (Ac-Phe), o un aminoácido cargado; en el que R10 se selecciona de un grupo que consiste en las SEQ ID NO: 19-21 y 53; y

(xiv) cualquiera de (x) a (xiii) en que el carboxilato C-terminal está sustituido por una amida

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Antagonista de glucagón, según la reivindicación 5, en el que: (A) cuando Y o Z es un aminoácido cargado, el aminoácido cargado se selecciona del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp y Glu, o (B) el antagonista de glucagón comprende además de uno a dos aminoácidos cargados C-terminales a Z, cuando C comprende X-Y-Z.

7. Antagonista de glucagón, según la reivindicación 5 ó 6, en el que B comprende la modificación de aminoácido designada como (v) o (vi), o una combinación de las mismas.

8. Antagonista de glucagón, según la reivindicación 7, en el que B comprende además una o más modificaciones de aminoácido seleccionadas del grupo que consiste en (iv), (vii), (viii), (ix) y una combinación de las mismas.

9. Antagonista de glucagón, según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, que comprende (A) un grupo hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 21 ó 24, según la numeración de la SEQ ID NO: 1, o el residuo N-terminal o C-terminal del antagonista de glucagón o (B) un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o un grupo alquilo a través de un enlace éster, éter, tioéter, amida o alquilamina, en el que el aminoácido está en la posición 10, 20 ó 24 (según la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1), o es el residuo N-terminal o C-terminal del antagonista de glucagón o, (C) tanto (A) como (B).

10. Dímero o multímero que comprende dos o más antagonistas de glucagón, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, o un conjugado que comprende un antagonista de glucagón, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, y un péptido heterólogo.

11. Composición farmacéutica estéril que comprende un antagonista de glucagón, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, un dímero o multímero o conjugado, según la reivindicación 10, o una combinación de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

12. Composición para utilizar en el tratamiento de hiperglucemia, supresión del apetito, reducción de la ganancia de peso, inducción de la pérdida de peso, o tratamiento del desgaste catabólico en un paciente, que comprende un péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9, un dímero o multímero o conjugado, según la reivindicación 10, o una combinación de los mismos.

Figura 1: Estabilidad de Glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} (37°C)

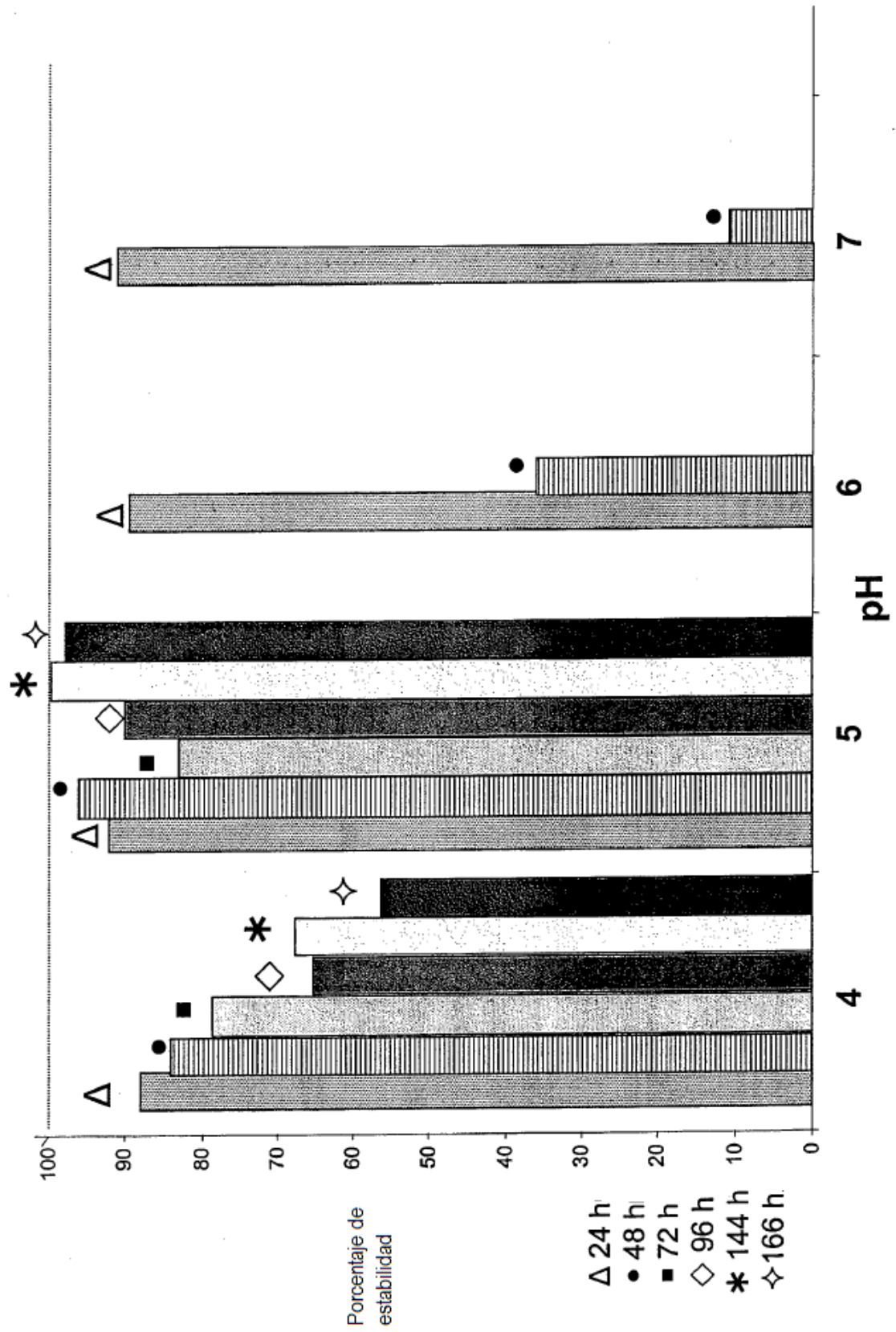
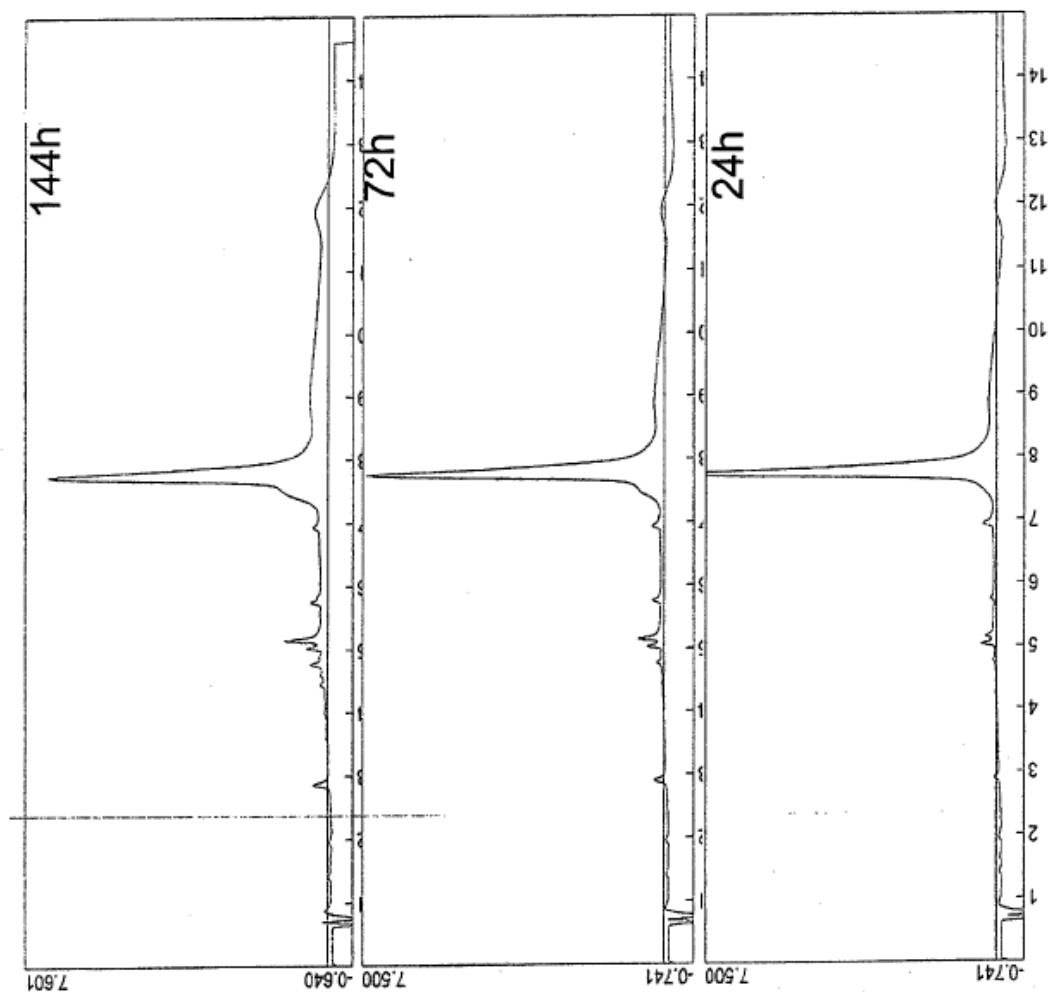
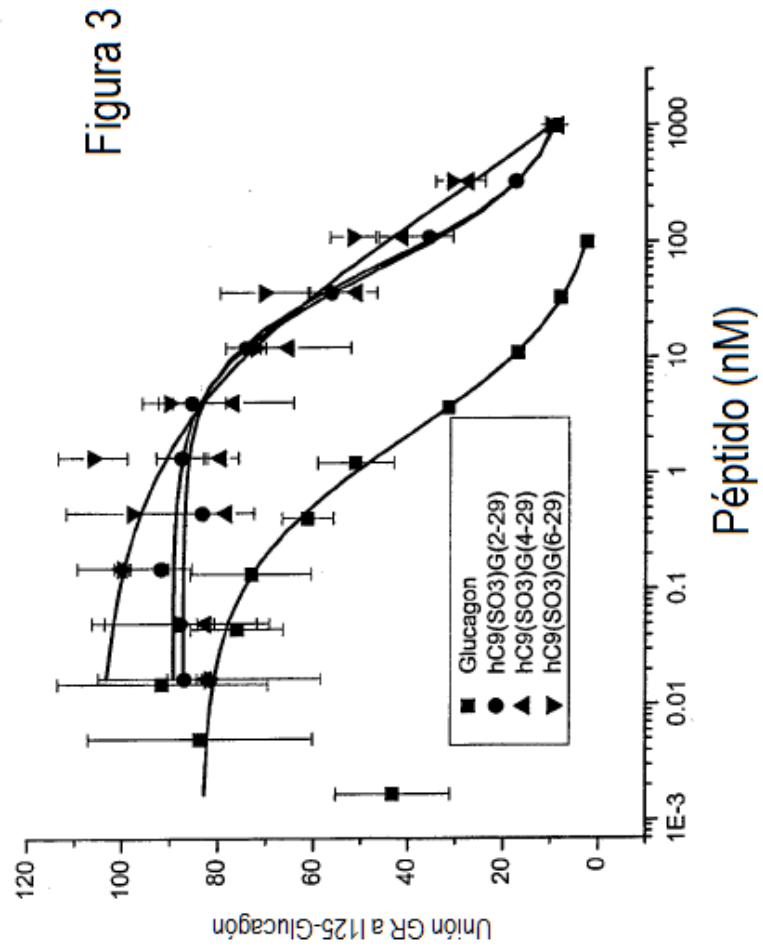


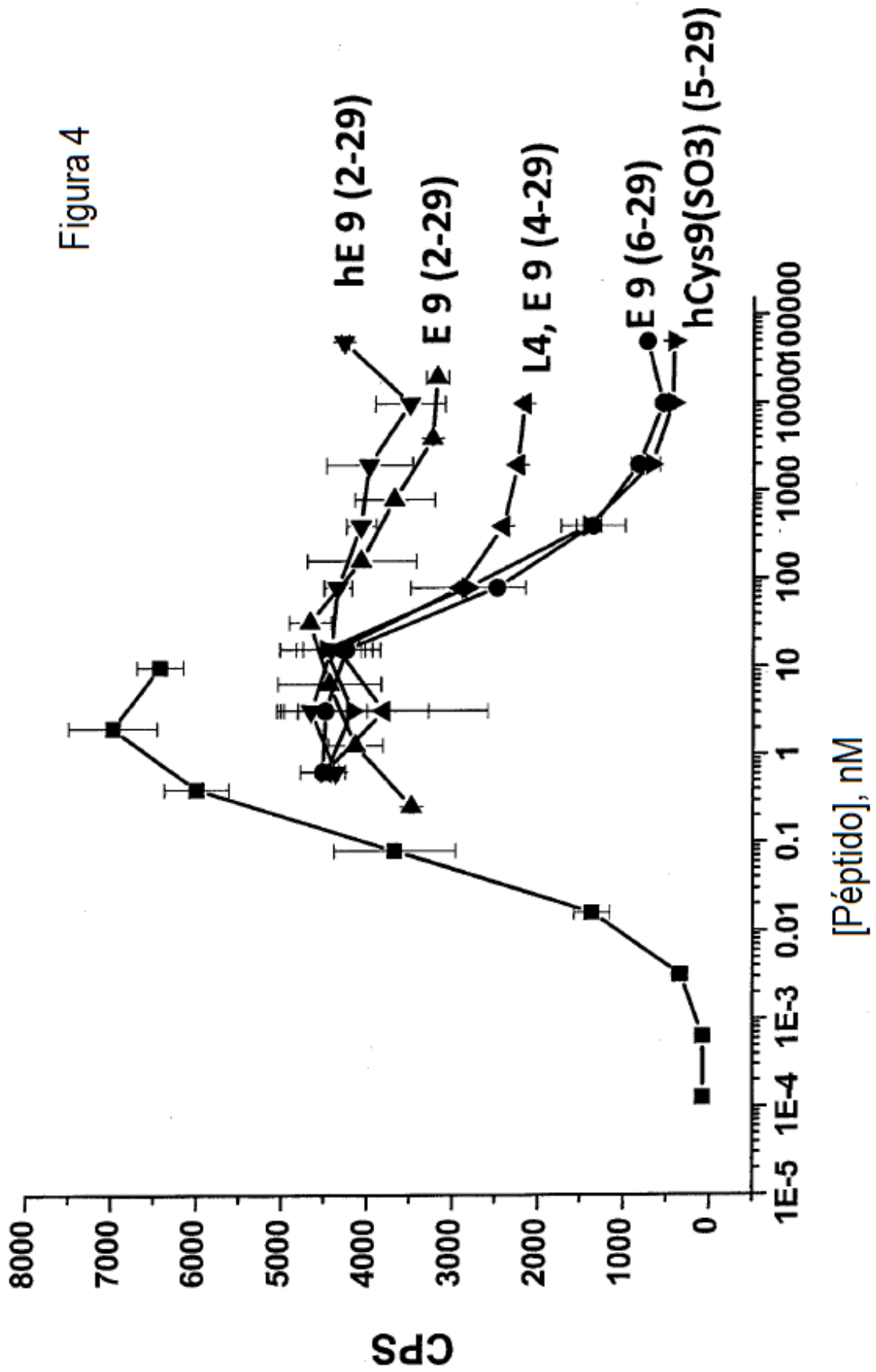
Figura 2: Análisis de Glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K}
a pH 5 (37°C)

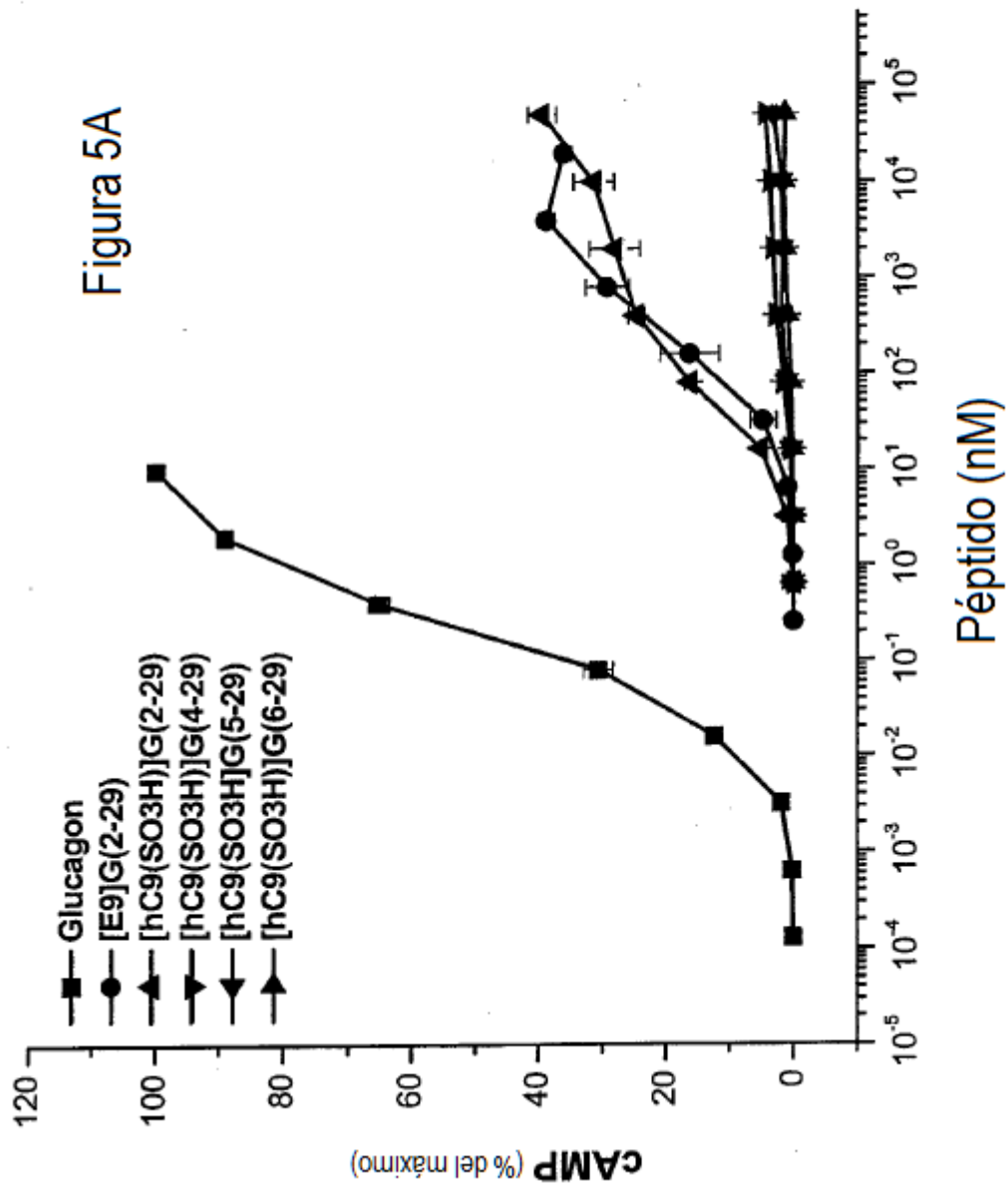




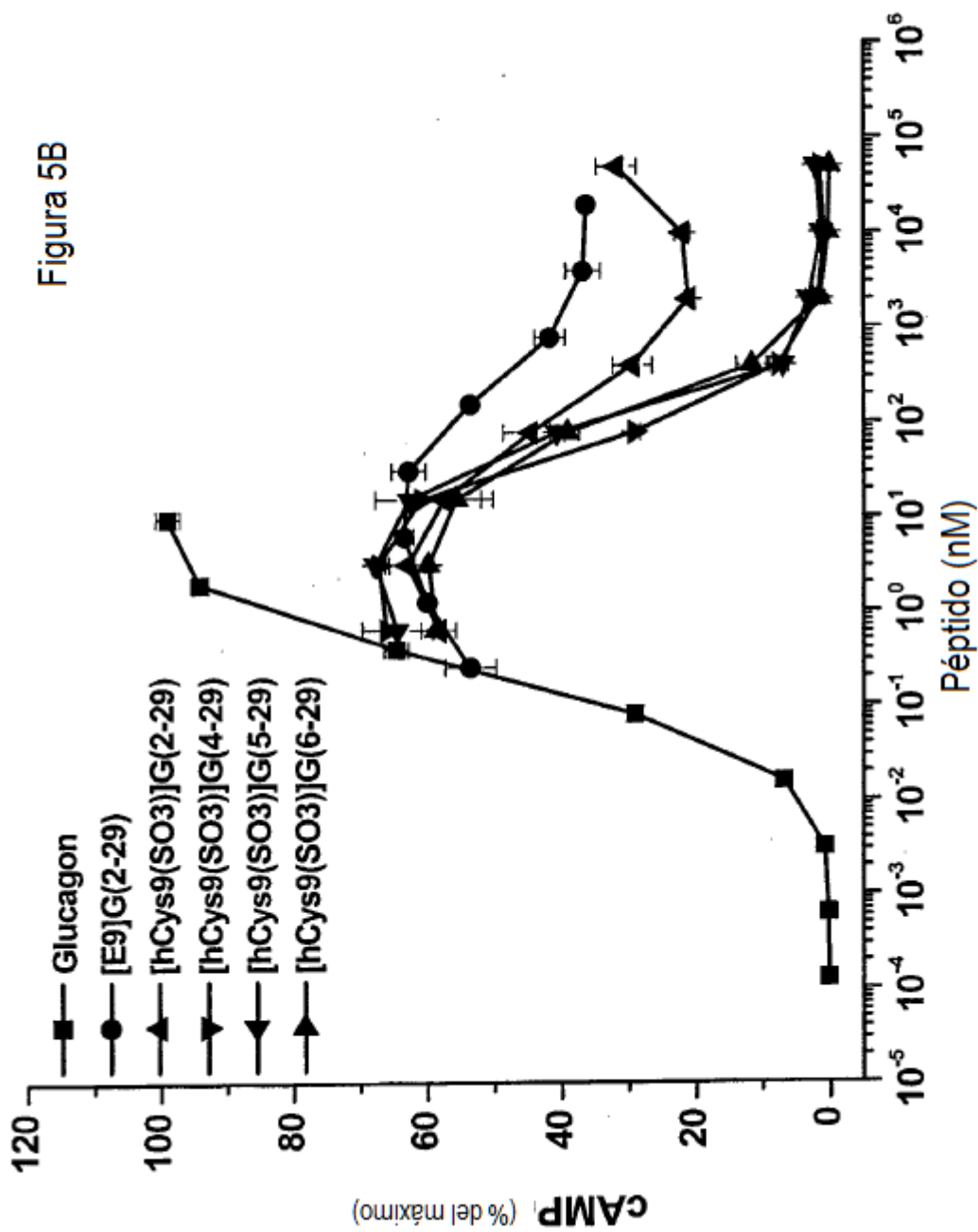
	IC50(nM)
Glucagon	Promedio $\pm$ SD
	2.81 $\pm$ 0.60
hC9(SO3)G(2-29)	37.03 $\pm$ 0.24
hC9(SO3)G(4-29)	37.0 $\pm$ 0.41
hC9(SO3)G(6-29)	48.9 $\pm$ 24.1

Inducción de cAMP mediada por receptor de glucagón





Estimulación de la liberación de cAMP en células receptoras de glucagón



Inhibición de la liberación de cAMP inducida por glucagón (0,2 nM)

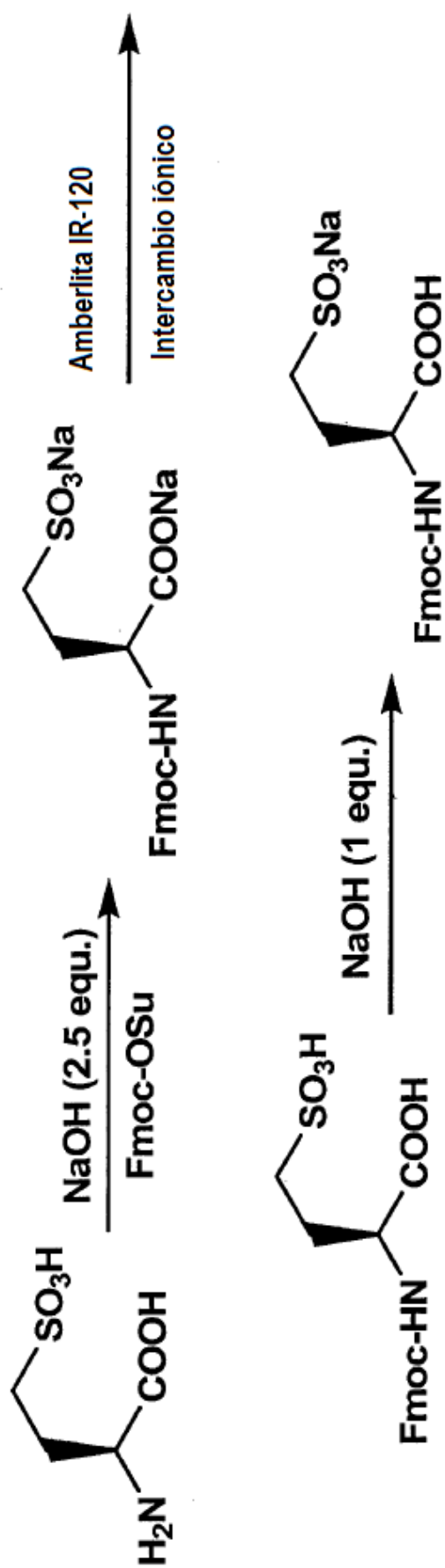
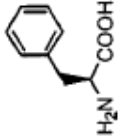
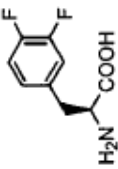
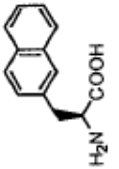
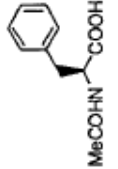
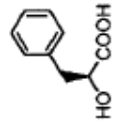
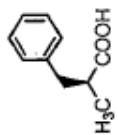
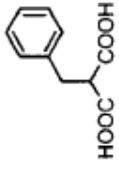
Esquema 1. Síntesis de Fmoc-hCys(SO₃Na)-COOH

Figura 6

Figura 7: F⁶TSEYSKYLD⁶SRRAQDFVQWLMNT [E⁹]glucagon(6-29)

Péptido	Resíduo 6	IC ₅₀ (nM)	cAMP	
			pA ₂	(I/A) ₅₀
[E ⁹]G(6-29)-NH ₂		36.35 ± 5.23 (n=3)	7.16 ± 0.27	486
[3,4-2(F)-F ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		36.70 ± 0.54 (n=1)	7.35±0.08	665
[2-Nal ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		95.16±1.32 (n=2)	7.17±0.64	206 (n=2)
[Ac-F ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		37.09±0.26 (n=2)	6.67±0.63	749 (n=2)
[PLA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (PLA: ácido 3-fenilacético)		12.34± 0.13 (n=2)	7.67±0.30	212 (n=3)
[MCA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (MCA: ácido alfa-metilhidrocinnâmico)		114.4±5.76 (n=2)	6.90±0.83	233 (n=2)
[BMA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (BMA: ácido benclmalônico)		80.56± 17.91(n=2)	6.43±1.44	1174

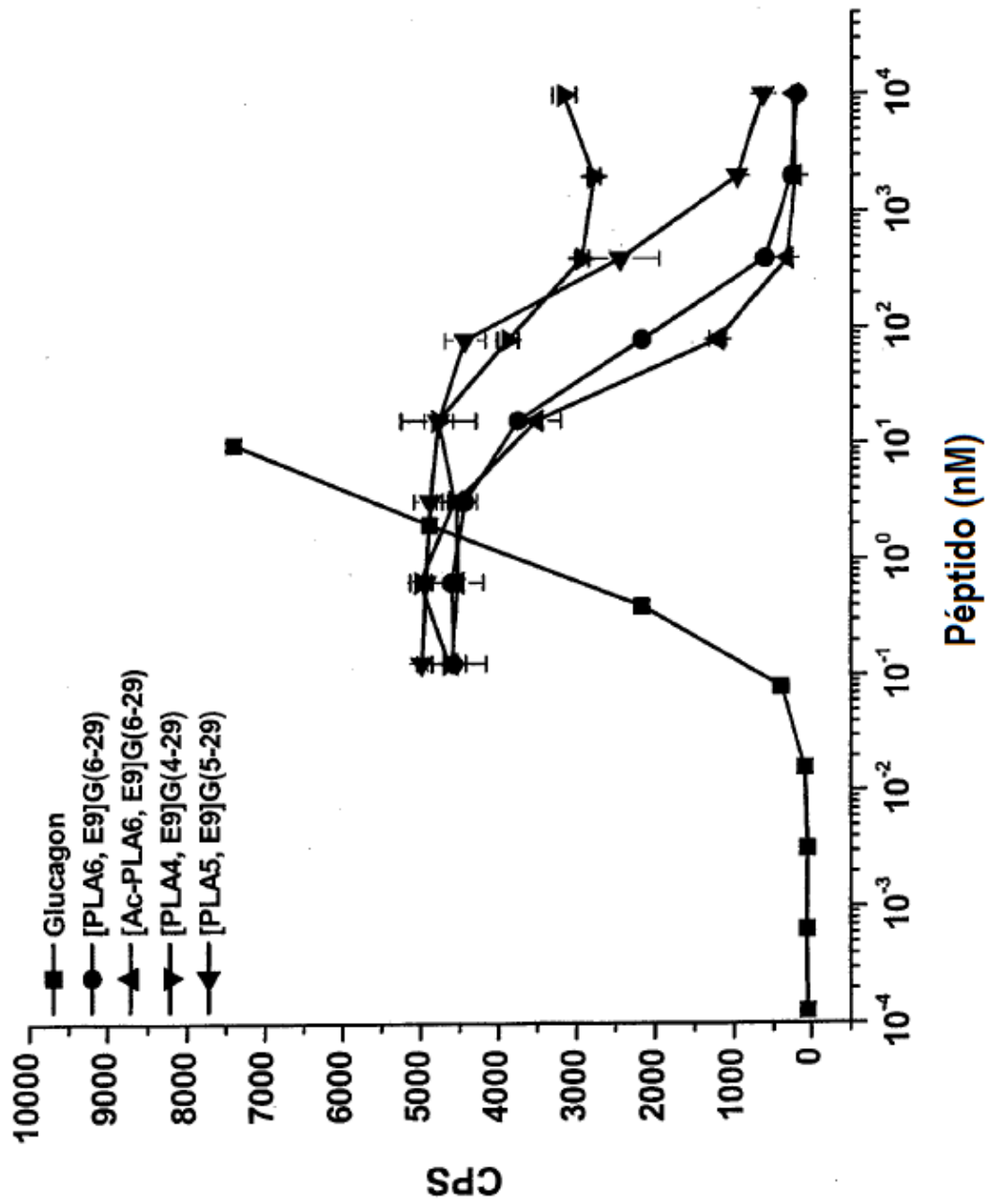


Figura 8: Inhibición de la liberación de cAMP inducida por glucagón 0,8 mM