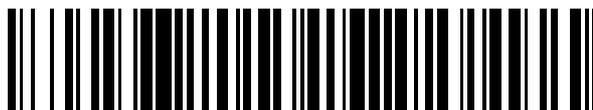


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 155**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2008 E 08845541 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2015 EP 2214691**

54 Título: **Compuestos que muestran actividad antagonista de glucacón y agonista de GLP-1**

30 Prioridad:

30.10.2007 US 983766 P

20.08.2008 US 90441 P

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

02.02.2016

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. ;
YANG, BIN y
OUYANG, CHENGUANG**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 558 155 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

Compuestos que muestran actividad antagonista de glucagón y agonista de GLP-1

5 ANTECEDENTES

10 [0001] El preproglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa en diferentes tejidos para formar un conjunto de diferentes péptidos derivados de proglucagón, incluyendo glucagón, péptido-1 de tipo glucagón (GLP-1), péptido-2 de tipo glucagón (GLP-2) y oxintomodulina (OXM), que están involucrados en una amplia variedad de funciones fisiológicas, incluyendo homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico, y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 33 a 61 de preproglucagón, mientras que el GLP-1 se produce como un péptido de 37 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 72 a 108 de preproglucagón. La amida de GLP-1 (7-36) o el ácido de GLP-1 (7-37) son formas biológicamente potentes de GLP-1, que demuestran una actividad esencialmente equivalente en el receptor de GLP-1.

20 [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. De este modo, el papel general del glucagón en la regulación de la glucosa es contrarestar la acción de la insulina y mantener los niveles de glucosa en sangre a través de una mayor síntesis y movilización de la glucosa en el hígado. 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, 176 (1996)). Estos estudios sugieren que el antagonismo del glucagón podría ser útil en el control glucémico de la diabetes.

30 [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 adenilil ciclasa que da lugar a un aumento de los niveles de AMPc. En informes anteriores se han identificado antagonistas de glucagón con base de péptidos, (ver Unson, CG et al. (1989) *J. Biol. Chem.* 264, 789-94, Ahn, J. et al. (21) *J. Peptide Research* 58, 151-8 y Ahn J. et al. (21) *J. Med. Chem.* 44, 1372-9), así como antagonistas de glucagón con base de nucleótidos (Sloop K. et al. (2004) *J. Clinical Invest.* 113, 1571-1581). La inhibición con base de péptidos actúa a nivel de unión del receptor, mientras que el último funciona mediante la supresión de ARNm intracelular específico para el receptor del glucagón.

40 [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* 1, 1171; Post et al., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 9, 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. (21) *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).

50 [0005] GLP-1 tiene diferentes actividades biológicas en comparación con glucagón. Sus acciones incluyen la estimulación de la síntesis y secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, y la inhibición de la ingesta de alimentos. Se ha demostrado que GLP-1 reduce la hiperglucemia (niveles de glucosa elevados) en diabéticos. La exendina-4, un péptido del veneno de lagarto que comparte aproximadamente el 50% de identidad de aminoácidos con GLP-1, activa el receptor de GLP-1 y del mismo modo se ha demostrado que reduce la hiperglucemia en los diabéticos.

55 [0006] También hay evidencias de que el GLP-1 y la exendina-4 pueden reducir la ingesta de alimentos y promover la pérdida de peso, un efecto que sería beneficioso no sólo para los diabéticos, sino también para los pacientes que sufren de obesidad. Los pacientes con obesidad tienen un mayor riesgo de diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular y las enfermedades musculoesqueléticas.

60 [0007] Tal como se describe en el presente documento, se proporcionan análogos de glucagón que muestran una actividad de alta potencia, tanto como antagonistas de glucagón como agonistas de GLP-1. Más particularmente, el nuevo antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 representan nuevas modificaciones químicas del extremo N-terminal de la secuencia de glucagón natural, y sustituciones de la secuencia de glucagón natural que permiten la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del compuesto. Los nuevos compuestos antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se pueden usar en cualquier situación en la que se desea el antagonismo del glucagón simultáneamente al agonismo del GLP-1. Según una realización, los compuestos se pueden usar en el tratamiento de la diabetes o la obesidad.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA

5 **[0008]** La presente invención se refiere a un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

[0009] La presente invención también se refiere a un multímero o dímero que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

10 **[0010]** La presente invención se refiere además a un conjugado que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

[0011] La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica estéril tal como se define en las reivindicaciones.

15 **[0012]** La presente invención se refiere además al antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, el multímero o dímero, o el conjugado, tal como se define en las reivindicaciones, o una combinación de los mismos, para utilizar en el tratamiento de la hiperglucemia o diabetes, en la supresión del apetito, la reducción de la ganancia de peso, o la inducción de la pérdida de peso en un paciente.

20 **[0013]** Según una realización, se proporcionan análogos de glucagón que demuestran un antagonismo de glucagón selectivo potente y un agonismo de péptido de tipo glucagón selectivo (GLP-1) (antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1). Se ha observado por separado que estas dos actividades son propiedades altamente deseables para el tratamiento del síndrome metabólico, específicamente la diabetes y la obesidad. La actividad antagonista del glucagón es útil en cualquier entorno en el que se desea la supresión de agonismo de glucagón. La presencia del agonismo de GLP-1 suprime adicionalmente la secreción endógena de glucagón del páncreas, a la vez que se estimula la síntesis y secreción de insulina. Las dos acciones farmacológicas actúan de una manera sinérgica para normalizar anomalías metabólicas. Estos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 pueden modificarse adicionalmente para mejorar la solubilidad y la estabilidad de los compuestos, a la vez que se mantiene la actividad antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 del compuesto original.

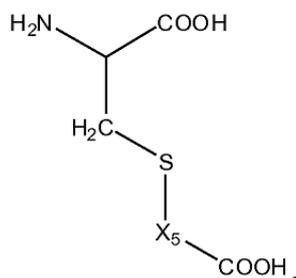
25 **[0014]** Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende un péptido de glucagón que ha sido modificado mediante la delección de los primeros 1 a 5 residuos de aminoácido (por ejemplo, primer aminoácido, dos primeros dos aminoácidos, tres primeros aminoácidos, cuatro primeros aminoácidos, cinco primeros aminoácidos) desde el extremo N-terminal, y la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del compuesto (alrededor de las posiciones de aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos de glucagón tipo natural, SEQ ID NO: 1), por ejemplo, mediante la unión de las cadenas laterales de pares de aminoácidos, seleccionadas de las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28 (con respecto a la secuencia del péptido de glucagón natural), entre sí a través de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, tales como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes. Alternativamente, la estabilización de la hélice alfa alrededor de los residuos 12-29 se logra mediante la introducción de uno o más aminoácidos α,α -disustituidos en las posiciones que mantienen la actividad deseada. En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) del péptido de glucagón o análogo del mismo está sustituido con un aminoácido α,α -disustituido. Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) de un péptido de glucagón o análogo del mismo con ácido amino iso-butírico (AIB) proporciona una hélice alfa estabilizada en ausencia de un puente salino o lactama. En algunas realizaciones, una, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 o 24 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) están sustituidas con AIB.

30 **[0015]** Según una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 representa una modificación adicional del péptido de glucagón en el que además de la supresión N-terminal, se modifica la fenilalanina en la posición 6 del péptido de glucagón natural, por ejemplo, para comprender un grupo hidroxilo en lugar del grupo amino N-terminal. En una realización adicional, el ácido carboxílico natural del aminoácido C-terminal se sustituye por un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster. En otra realización, el residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (posición 9 del péptido de glucagón natural) se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido β -homoglutámico, un derivado con ácido sulfónico de la cisteína, o un derivado con alquilcarboxilato de la cisteína que tiene la estructura de:

60

65

5



10

15

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

[0016] En una realización, el derivado con ácido sulfónico de la cisteína es el ácido cisteico o ácido homocisteico.

20

[0017] En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51, y más particularmente, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25.

25

[0018] También se proporciona aquí un péptido o conjugado del mismo que comprende (1) un puente intramolecular, o un aminoácido alfa,alfa-disustituido, o un aminoácido ácido en la posición 16 (según la numeración de SEQ ID NO: 1), o una combinación de los mismos, (2) una amida o éster C-terminal en lugar de un carboxilato C-terminal, y (3) una estructura general de A-B-C,

en la que A se selecciona del grupo que consiste en:

30

(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;

35

B representa los aminoácidos i a 26 de la SEQ ID NO: 1, en el que i es 3, 4, 5, 6, o 7, que comprende opcionalmente una o más modificaciones de aminoácidos, tal como se describe adicionalmente en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas para los péptidos de glucagón o análogos de glucagón o antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1;

y C se selecciona del grupo que consiste en:

40

(x) X;

40

(xi) X-Y;

(xii) X-Y-Z; y

(xiii) X-Y-Z-R10,

45

donde 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 NOs: 21, 26, 27, y 50.

50

[0019] En una realización, el aminoácido carboxi terminal del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 descrito aquí está unido covalentemente a un segundo péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 21, 26, 27, y 50. Por ejemplo, en una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 está unido covalentemente a un segundo péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 26 (KRNRNNIA), SEQ ID NO: 27 (KRNR) y SEQ ID NO: 50 (GPSSGAPPPSX).

55

[0020] En todavía otras realizaciones de ejemplo, cualquiera de los compuestos anteriores pueden modificarse adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido correspondiente a la posición 15 o 16 de glucagón natural, para reducir la degradación del péptido con el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos.

60

[0021] Los conjugados de antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 también se proporcionan, en los que el péptido de glucagón está unido, opcionalmente a través de un enlace covalente y, opcionalmente, a través de un enlazador, a un grupo conjugado.

65

[0022] En otra realización, la solubilidad del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se ve aumentada por el enlace covalente de un grupo hidrófilo al péptido. En una realización, el grupo hidrófilo es una cadena de

polietilenglicol (PEG). Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, en el que el grupo hidrófilo se une covalentemente a un residuo de aminoácido correspondiente a la posición 16, 21 o 24 del glucagón natural. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14 en el que una cadena de polietilenglicol está unida covalentemente al aminoácido en la posición 16 de la SEQ ID NO: 13, en la posición el 19 de SEQ ID NO: 14 o en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 12. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En otra realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20.000 Daltons. Alternativamente, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 12 y tiene una cadena de polietilenglicol unida covalentemente a las posiciones de aminoácidos 16 y 19 de la SEQ ID NO: 12, 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 de aproximadamente 20.000 Daltons.

[0023] En otra realización, la solubilidad de cualquiera de los antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 anteriores 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 al aminoácido correspondiente a la posición 27 del glucagón natural (es decir, C-terminal a la posición 22 del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1). Opcionalmente, se pueden introducir uno, dos o tres aminoácidos cargados en la parte C-terminal, preferiblemente C-terminal a la posición 22 del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. Según una realización, el aminoácido o aminoácidos naturales en las posiciones 23 y/o 24 del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 están sustituidos por un aminoácido cargado, y/ o en una realización adicional también 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.

[0024] En aún otra realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 ha sido modificado por truncamiento o deleción de uno o dos aminoácidos del extremo C-terminal del péptido glucagón (es decir, la posición 29 y/o las posiciones 28 y 29 del péptido glucagón natural).

[0025] En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se modifica para comprender uno o más aminoácidos de GLP-1 natural mediante sustitución del residuo o residuos de glucagón natural en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Por ejemplo, el antagonista del glucagón puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 2, 3, 17, 18, 21, 23, y 24 (según la numeración de aminoácidos de glucagón natural). En una realización específica, el antagonista de glucagón/péptido GLP-1 se modifica mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Ser2 se sustituye por Ala, Gln3 se sustituye por Glu, Arg17 se sustituye por Gln, Arg en la posición 18 se sustituye por Ala, Asp en la posición 21 se sustituye por Glu, Val en la posición 23 se sustituye por Ile, y Gln en la posición 24 se sustituye por Ala (las posiciones de los aminoácidos están según la secuencia de glucagón natural).

[0026] Se pueden realizar modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservativas, en los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 que todavía permiten que conserve su actividad en los receptores de glucagón y GLP-1. Por lo tanto, el presente documento contempla que cualquiera de los análogos de glucagón descritos en este documento puedan ser modificados adicionalmente para comprender hasta 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos adicionales, y todavía mantener el nivel deseado de actividad de un antagonista de glucagón y agonista de GLP-1 en los receptores de glucagón y GLP-1.

[0027] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente pueden aplicarse individualmente o en combinación.

[0028] Las sales farmacéuticamente aceptables del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 también están abarcados por la presente descripción.

[0029] Los dímeros de los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento también son abarcados por la presente descripción. En una realización, se proporciona un dímero de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende dos secuencias seleccionadas de forma independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, en donde los dos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 están unidos entre sí a través de un enlazador unido de forma independiente a la posición 16, 19, 24 y 35 (cuando el péptido de extensión de la SEQ ID NO: 50 se añade al extremo carboxilo del análogo de glucagón) de las respectivas cadenas peptídicas.

[0030] Según una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende los nuevos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones que están esterilizadas y contenidas dentro de varios envases. Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar adicionalmente como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para la administración de la composición a un paciente.

[0031] Según una realización, se proporciona un procedimiento para tratar rápidamente la hiperglucemia utilizando una composición acuosa preformulada. El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 nuevo modificado del presente documento. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 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 se preenvasa en un dispositivo que se utiliza para administrar la composición al paciente que sufre de la hiperglucemia.

[0032] Según una realización, se proporciona un procedimiento mejorado de regulación de los niveles de glucosa en sangre en pacientes dependientes de la insulina. El procedimiento comprende las etapas de administrar insulina en una cantidad terapéuticamente eficaz para el control de la diabetes y administrar un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 modificado nuevo del presente documento, en el que dichas etapas de administración se llevan a cabo dentro de los doce horas una de la otra. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 y la insulina se coadministran como una composición única, en el que el análogo 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. Se espera que dichos procedimientos para el tratamiento de la hiperglucemia sean útiles para una variedad de tipos de hiperglicemia, incluyendo la diabetes, diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, o diabetes gestacional, ya sea dependiente de insulina o no dependiente de insulina, y la reducción de las complicaciones de la diabetes incluyendo la nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

[0033] Además se ha descrito que la estimulación de GLP-1 inducirá la pérdida de peso o prevendrá la ganancia de peso. En consecuencia, se cree que el antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento serán eficaces en la inducción de pérdida de peso o prevención de la ganancia de peso. Además, otro compuesto que induce la pérdida de peso es oxintomodulina, una hormona digestiva natural que se encuentra en el intestino delgado (ver Diabetes 2005; 54: 2390-2395). La oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que contiene la secuencia de 29 aminoácidos del glucagón (es decir, SEQ ID NO: 1) seguido de una extensión de 8 aminoácidos carboxi terminal de la SEQ ID NO: 26 (KRNRNNIA). Si bien se contempla que los péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento opcionalmente pueden estar unidos a esta extensión de 8 aminoácidos carboxi terminal (SEQ ID NO: 26), el presente documento contempla específicamente análogos que carecen de los 8 aminoácidos contiguos de la SEC ID NO: 26. Tales procedimientos para reducir el apetito o promover la pérdida de peso corporal se espera que sean útiles en la reducción del peso corporal, la prevención de la ganancia de peso, o 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, isquemia-reperfusión, etc.), la hipertensión, la aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0034]

Figura 1 es un gráfico de barras que representa la estabilidad de glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} a 37°C incubado durante 24, 48, 72, 96, 144 y 166 horas, respectivamente.

Figura 2 representa los datos generados a partir de análisis de HPLC de glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} a pH 5 incubado a 37°C durante 24, 72 o 144 horas, respectivamente.

Figuras 3 A y 3B representan los datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los análogos de glucagón indicados, medido por la producción de AMPc. Los análogos ensayados tienen uno, tres, cuatro o cinco aminoácidos eliminados del extremo amino terminal del péptido glucagón y una sustitución de ácido glutámico en la posición 4. Más particularmente, la figura 3A compara la inducción del receptor de glucagón por análogos de glucagón [E9]G(2-29) ●, [E9]G(4-29) ▲, [E9]G(5-29) ▼, [E9]G(6-29) ◀ en relación con glucagón natural ■. Figura 3B proporciona datos sobre el efecto inhibitorio de los mismos análogos en la inducción del receptor de glucagón por 0,2 nM de glucagón. Abreviaturas: E9 = una sustitución de ácido glutámico por el aminoácido correspondiente a la posición 9 de glucagón natural; G(X-29) = glucagón natural truncado en N-terminal por X - 1 aminoácidos.

Figura 4 representa los datos que comparan la afinidad de unión y la actividad de receptor de glucagón de análogos de glucagón que se modifican con respecto al glucagón natural mediante la delección de los primeros 5 aminoácidos nativos, y que difieren entre sí sobre la base de modificaciones en el aminoácido N-terminal ("residuo 6" de glucagón natural).

Figura 5 representa los datos generados midiendo el agonismo del receptor de GLP-1 de los análogos de glucagón indicados, medido por la producción de AMPc. Más particularmente, la Figura 5 compara la inducción del receptor de GLP-1 por análogos de glucagón [E9]G(6-29) ●, [PLA6, E9]G(6-29) ▲, [E9]G(6-CEX) ▼, [E9, E16]G(6-CEX) ◀, [PLA6, E9, E16]G(6-CEX) ▶ con respecto a GLP-1 natural. Abreviaturas: PLA6 = ácido fenil láctico; G (6-29) = glucagón natural truncado en N-terminal por 5 aminoácidos; E9 = una sustitución de ácido glutámico por el aminoácido correspondiente a la posición 9 de glucagón natural; G (6-CEX) = glucagón natural truncado en N-terminal por 5 aminoácidos con los aminoácidos adicionales de SEQ ID NO: 21 añadidos al extremo carboxilo.

Figuras 6A y 6B representan datos generados midiendo la actividad en los receptores de glucagón y GLP-1. Figura 6A representa los datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los análogos de glucagón indicados en presencia de 0,8 nM de glucagón natural, medido por la producción de AMPc. Más particularmente, la

Figura 6A compara la inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,8 nM por análogos de glucagón [PLA6, E9]G(6-29)●, [PLA6, D9, K12E16(L), D28]G(6-29)▲, [PLA6, D9, E16K20(L), D28]G(6-29)▼ con respecto a glucagón natural ■. Figura 6B representa los datos generados midiendo la liberación de AMPc inducida por GLP-1 por análogos de glucagón [PLA6, D9, D28]G(6-29)●, [PLA6, D9, K12E16(L), D28]G(6-29)▲, [PLA6, D9, E16K20(L), D28]G(6-29)▼ con respecto al glucagón natural ■. Estos datos demuestran que la introducción de un esqueleto de lactama en un antagonista de glucagón mantiene un antagonismo potente sin agonismo residual. Abreviaturas: PLA6 = ácido fenil láctico; G(6-29) = glucagón natural truncado en N-terminal por 5 aminoácidos; D9 = la Asp nativa correspondiente a la posición 9 de glucagón natural; E9 = una sustitución de ácido glutámico por el aminoácido correspondiente a la posición 9 de glucagón natural; D28 = una sustitución de ácido aspártico por el aminoácido correspondiente a la posición 28 de glucagón natural; G(6-CEX) = glucagón natural truncado en N-terminal por 5 aminoácidos con los aminoácidos adicionales de SEQ ID NO: 21 añadidos al extremo carboxilo; K12E16(L) = un puente de lactama formado entre las cadenas laterales de los aminoácidos que corresponden a la lisina en la posición 12 y el ácido glutámico en la posición 16 del péptido glucagón natural. E16K20(L) = un puente de lactama formado entre las cadenas laterales de los aminoácidos que corresponden al ácido glutámico en la posición 16 y la lisina en la posición 20 del péptido glucagón natural.

Figuras 7A y 7B representan datos generados midiendo la actividad de los derivados con lactama de glucagón en los receptores de glucagón y GLP-1. Figura 7A representa los datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los análogos de glucagón indicados en presencia de 0,2 nM de glucagón natural, medido por la producción de AMPc. Más particularmente, la Figura 7A compara la inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,2 nM por análogos de glucagón [PLA6, E9]G(6-29)●, [E9, E16]G(6-CEX)▲, [E9, K12E16(L)]G(6-CEX)▼, [PLA6, E9, K12E16(L)]G(6-CEX)◀, [E9, E16, K20]G(6-CEX)▶, [E9, E1620(L)]G(6-CEX)◆, [PLA6, E9, E16K20(L)]G(6-29)♣ relativa al glucagón natural ■. Figura 7B representa los datos generados midiendo la liberación de AMPc inducida por GLP-1 por análogos de glucagón [E9]G(6-CEX)●, [E9, E16]G(6-CEX)▲, [D9, K12E16(L)]G(6-CEX)▼ [E9, K12E16(L)]G(6-CEX)◀, [PLA6, E9, K12E16(L)]G(6-CEX)▶, [E9, E16, K20]G(6-CEX)◆, [E9, E16K20(L)]G(6-CEX)♣, [PLA6, E9, E16K20(L)]G(6-CEX)■ con respecto al glucagón natural ■. Las abreviaturas son consistentes con las usadas en las figuras 6A y 6B.

Figuras 8A y 8B representan datos generados midiendo la actividad de derivados lactámicos de glucagón pegilado en los receptores de glucagón y GLP-1. Figura 8A representa los datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los análogos de glucagón indicados en presencia de 0,8 nM de glucagón natural, medido por la producción de AMPc. Más particularmente, la Figura 8A compara la inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,8 nM por análogos de glucagón [PLA6, D9, E16K20(L), D28]G(6-29)▲, [PLA6, D9, E16K20(L), C24(20KPEG), D28]G(6-29)▼, [PLA6, D9, K12E16(L), C24(20KPEG), D28]G(6-29)◀ [PLA6, D9, E16K20(L), D28, C35 (20K PEG)]G(6-CEX)▶, con relación al glucagón natural ■. Figura 7B representa los datos generados midiendo la liberación de AMPc inducida por GLP-1 por análogos de glucagón [PLA6, D9, E16K20(L), D28]G(6-29)▲, [PLA6, D9, E16K20(L), C24(20K PEG), D28]G(6-29)▼, [PLA6, D9, K12E16(L), C24(20K PEG), D28]G(6-29)◀ [PLA6, D9, E16K20(L), D28, C35(20K PEG)]G(6-CEX)▶, relativa a GLP-1 natural ■. Las abreviaturas son consistentes con las usadas en las figuras 6A y 6B.

Figuras 9A-9C representan datos generados midiendo la actividad de derivados lactámicos de glucagón en los receptores de glucagón y GLP-1. Figura 9A representa los datos generados midiendo el antagonismo del receptor de glucagón de los análogos de glucagón indicados en presencia de 0,8 nM de glucagón natural, medido por la producción de AMPc. Más particularmente, la Figura 9A compara la inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,8 nM por análogos de glucagón [PLA6, E16K20(L), D28]G(6-29)●, [E9, E16K20(L), D28]G(4-29)▲, [E16K20(L), D28]G(2-29)▼, [A2, E3, E16K20(L), D28]G(2-29)◀, [A2, E3, E16K20(L), D28]G(1-29)▶, ANK2 (SEQ ID NO: 37)◆ con respecto al glucagón natural ■. Figura 9B representa los datos generados midiendo la liberación de AMPc inducida por glucagón por análogos de glucagón [E16K20(L), D28]G(4-29)▲, [E16K20(L), D28]G(2-29)▼, [A2, E3, E16K20(L), D28]G(2-29)◀, [A2, E3, E16K20(L), D28]G(1-29)▶, ANK2 (HSQGTFTSDYARYLDARRAREFIKWLVRGRG; SEQ ID NO: 37, un compuesto de la técnica anterior)◆ con respecto a GLP-1 natural ■. Figura 9C representa datos generados midiendo la liberación de AMPc inducida por GLP-1 por análogos de glucagón [E9, E16K20(L), D28]G(4-29)●, [E16K20(L), D28]G(2-29)▲, [A2, E3, E16K20(L), D28]G(2-29)▼, [A2, E3, E16K20(L), D28]G(1-29)◀, ANK2 (SEQ ID NO: 37)▶, [PLA6, E16K20(L), D28]G(6-29)◆ con respecto al GLP-1 natural ■. Las abreviaturas son consistentes con las usadas en las figuras 3, 6A y 6B.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

[0035] Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones establecidas a continuación.

[0036] 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.

[0037] 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.

[0038] 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.

[0039] 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 plúvico, 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.

[0040] 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 prevención o eliminación de dichos síntomas. Por ejemplo, tal como se utiliza aquí, el término "tratamiento de la diabetes" se referirá en general al mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre cerca de los niveles normales y puede incluir aumentar o disminuir los niveles de glucosa en sangre dependiendo de una situación determinada.

[0041] 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.

[0042] El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra ruta, tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

[0043] Tal como se utiliza aquí, el término "glucagón natural" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, y el término "GLP-1 nativo" es un término genérico que designa la amida de GLP-1 (7-36) (que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 4), ácido de GLP-1 (7-37) (que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 3) o una mezcla de estos dos compuestos. Tal como se utiliza aquí, una referencia general a "glucagón" o "GLP-1" en ausencia de cualquier designación adicional se entiende glucagón natural o GLP-1 nativa, respectivamente.

[0044] Un "análogo 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 de glucagón o GLP, medida mediante la producción de AMPc utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 13.

[0045] El término "antagonista de glucagón" se refiere a un compuesto que contrarresta la actividad del glucagón o impide la función de glucagón medida mediante la producción de AMPc utilizando un ensayo de modelo *in vitro* validado, tal como el descrito en el Ejemplo 13. Por ejemplo, un antagonista de glucagón muestra al menos el 50 % de inhibición (por ejemplo, al menos 60%, al menos 70% de inhibición) y preferiblemente, al menos 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 un 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.

[0046] El término "agonista de GLP-1" se refiere a un compuesto que estimula la actividad del receptor de GLP, medida mediante la producción de AMPc utilizando un ensayo de modelo *in vitro* validado, tal como el descrito en el Ejemplo 13. Un agonista de GLP-1 en consecuencia muestra actividad de agonista de GLP-1. El término "actividad de agonista de GLP-1" se refiere a la actividad máxima en el receptor de GLP-1 de al menos aproximadamente el 10% a aproximadamente 200% o más (incluyendo al menos aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, o 175%) con respecto al GLP-1 natural.

[0047] Tal como se usa en el presente documento un "antagonista de glucagón/agonista de GLP-1" es un péptido que comparte más de aproximadamente 65% de identidad en la secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos del glucagón natural (SEQ ID NO: 1), pero se ha modificado para mostrar tanto actividad de antagonista de glucagón como actividad de agonista de GLP-1.

5 [0048] En algunas realizaciones, los péptidos descritos en esta memoria muestran una IC50 en el receptor de glucagón que está dentro de un intervalo que es aproximadamente 100 veces mayor o aproximadamente 100 veces menor que la EC50 en el receptor de GLP-1. Por ejemplo, un péptido de SEQ ID NO: 1 puede modificarse de tal manera que el péptido muestra al menos aproximadamente 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, aproximadamente 100%) del agonismo máximo alcanzado por el GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 y al menos aproximadamente 50% (por ejemplo, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente el 90%, aproximadamente 100%) de inhibición de la respuesta máxima alcanzada por glucagón natural en el receptor de glucagón.

15 [0049] En un ejemplo, un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende el análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 2 que ha sido modificada para tener una sustitución de ácido glutámico en la posición 11 de la SEQ ID NO: 2 o un puente intramolecular, por ejemplo, un puente de lactama, formado entre pares de residuos de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de 7 y 11, 11 y 15, 15 y 19, y 19 y 23 de la SEQ ID NO: 2.

20 [0050] A lo largo de la solicitud, todas las referencias a una posición de aminoácido particular por número, en ausencia de cualquier designación o referencia adicional a una SEQ ID NO: específica, se refieren a la posición de aminoácido de glucagón natural (SEQ ID NO: 1); numeradas consecutivamente empezando con el primer aminoácido de SEQ ID NO: 1 siendo la posición número 1, o la posición de aminoácido correspondiente en cualquier análogo del mismo. Sin embargo, cuando una posición de aminoácido particular se designa por el número mientras se hace referencia a una SEQ ID NO: específica, la posición de aminoácido designada se basa en la numeración consecutiva, comenzando con el primer aminoácido, de la SEQ ID NO: referenciada. Por ejemplo, el aminoácido en la posición 4 de la SEQ ID NO: 2 es el ácido aspártico.

25 [0051] 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.

30 [0052] 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.

35 [0053] 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;

40 II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas:

Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Residuos polares cargados positivamente:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

45 IV. Residuos alifáticos grandes, no polares:

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

V. Residuos aromáticos grandes:

Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

50 [0054] Tal como se utiliza aquí, el término general "cadena de polietilenglicol" o "cadena de 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 seleccionado en el intervalo de 500 a 40.000 Daltons. "Cadena de polietilenglicol" o "cadena de 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 5000.

55 [0055] 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 una cadena de polietilenglicol al compuesto. Un "análogo de glucagón pegilado" es un análogo de glucagón que tiene una cadena de PEG unida covalentemente al análogo de glucagón.

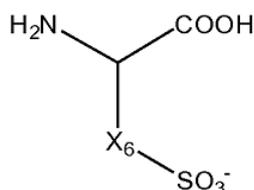
60 [0056] Tal como se utiliza aquí, una referencia general a un péptido pretende abarcar péptidos que tienen los extremos amino y carboxilo modificados. Por ejemplo, una cadena de aminoácidos que comprende un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal pretende estar abarcado por una secuencia de aminoácidos que designa los aminoácidos estándar.

65

[0057] 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 lábiles incluyen grupos fotoescindibles, grupos lábiles a ácidos, grupos lábiles a bases y grupos escindibles por enzimas.

[0058] 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.

[0059] 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 C_1-C_4 , alqueno C_2-C_4 o alquínilo C_2-C_4 .

[0060] El término "alquilo C_1-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 C_1-C_6 típicos incluyen, pero sin limitación, metilo, etilo, n -propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo y similares.

[0061] Los términos "alqueno C_2-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 ($-CH_2-CH=CH_2$), 1,3-butadienilo, ($-CH=CHCH=CH_2$), 1-butenilo ($-CH=CHCH_2CH_3$), hexenilo, pentenilo, y similares.

[0062] El término "alquínilo C_2-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.

[0063] 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 2 aminoácidos que se encuentran habitualmente en proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o no naturales.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 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

[0067] La presente invención se refiere a un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

[0068] La presente invención también se refiere a un multímero o dímero que comprende un antagonista de

glucagón/agonista de GLP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

[0069] La presente invención se refiere además a un conjugado que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 tal como se define en las reivindicaciones.

[0070] La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica estéril tal como se define en las reivindicaciones.

[0071] La presente invención se refiere además al antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, el multímero o dímero, o el conjugado, tal como se define en las reivindicaciones, o una combinación de los mismos, para utilizar en el tratamiento de la hiperglucemia o diabetes, en la supresión del apetito, la reducción de la ganancia de peso, o la inducción de la pérdida de peso en un paciente.

[0072] Las realizaciones relacionadas con la presente invención también se muestran a continuación junto con otras realizaciones que no pertenecen a la presente invención.

[0073] Se dan a conocer en el presente documento análogos de glucagón que funcionan como antagonistas de glucagón y agonistas de GLP-1. Dichos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 se utilizan en cualquier situación en la que se desea la supresión del agonismo de glucagón, a la vez que también se desea la estimulación simultánea de la actividad de GLP-1. Por ejemplo, la actividad antagonista del glucagón en conjunción con la estimulación de GLP-1 se puede utilizar en el tratamiento de la diabetes donde el antagonismo del glucagón se ha demostrado en modelos preclínicos de la hiperglucemia para producir una disminución de la glucosa en sangre y la actividad de GLP-1 se asocia con la producción de insulina. Los compuestos que demuestran la actividad de GLP-1 también se han conocido como útiles para el tratamiento de la obesidad y la prevención de la ganancia de peso.

[0074] Los solicitantes han descubierto que los análogos de glucagón que han sido modificados por la eliminación de los primeros 1 a 5 aminoácidos (por ejemplo, un primer aminoácido, los dos primeros aminoácidos, los tres primeros aminoácidos, los primeros cuatro aminoácidos, los primeros cinco aminoácidos) del extremo N-terminal y mediante la estabilización de la estructura de la hélice alfa en la parte C-terminal del péptido, incluyendo, por ejemplo, mediante la formación de un enlace intra-péptido de las cadenas laterales de dos aminoácidos entre sí, en el que el par de aminoácidos se selecciona entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28, muestran actividad tanto como antagonista de glucagón como como agonista de GLP-1.

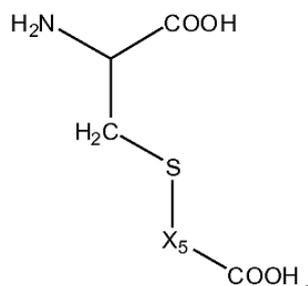
[0075] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, en el que el péptido muestra al menos el 80% del agonismo máxima alcanzado por GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, y muestra actividad antagonista del glucagón que reduce la producción máxima de AMPc inducida por glucagón en el receptor de glucagón en al menos aproximadamente 50%, medida por la producción de AMPc en un ensayo *in vitro*. En una realización, el péptido antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 muestra al menos 90% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, y muestra actividad antagonista de glucagón, que reduce la producción máxima de AMPc inducida por glucagón en el receptor de glucagón en al menos aproximadamente el 80%.

[0076] Según una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende un péptido derivado de la SEQ ID NO: 2 en el que el péptido glucagón comprende adicionalmente sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 2 en uno a tres posiciones de aminoácidos seleccionadas de las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22 y 24, y presenta al menos 90% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, y muestra actividad antagonista de glucagón, que reduce la producción máxima de AMPc inducido por glucagón en el receptor de glucagón en al menos aproximadamente el 80%.

[0077] En algunas realizaciones, la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) se estabiliza mediante, por ejemplo, la formación de un puente intramolecular covalente o no covalente, o sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12 a 29 con un aminoácido estabilizador de la hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido α,α -disustituido). En una realización, se forma un anillo de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos 7 y 11 o entre los aminoácidos 11 y 15 de la SEQ ID NO: 2. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21 ó 24 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) están sustituidas por un aminoácido α,α -disustituido, por ejemplo, ácido aminoisobutírico (AIB). En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende un péptido derivado de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 en el que el péptido glucagón comprende una sustitución de aminoácido adicional con respecto a SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 en una a tres posiciones de aminoácidos seleccionadas de las posiciones 1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14. En una realización, las sustituciones en las posiciones 1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14 son sustituciones de aminoácidos conservativas. En una realización, la treonina en la posición 24 de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 está sustituida por glicina.

[0078] Según una realización, se han preparado análogos de glucagón específicos en los que los primeros tres a cinco aminoácidos del glucagón natural se han suprimido, el aminoácido en la posición 9, en relación con el péptido glucagón natural, se ha sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido

homoglutámico, ácido β -homoglutámico, un derivado con ácido sulfónico de cisteína, o un derivado con alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



5
10
15 en el que X_5 es alquilo C_1 - C_4 , alqueno C_2 - C_4 o alquino C_2 - C_4 , y la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) se estabiliza, por ejemplo, a través de la formación de un puente de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos 12 y 16 o entre los aminoácidos 16 y 20, en relación con el péptido glucagón natural.

20 **[0079]** En una realización, el péptido glucagón comprende un péptido de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48, y en una realización adicional, el péptido glucagón comprende un péptido de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48 en el que el aminoácido en la posición 4 de esas secuencias es ácido glutámico y un grupo amida está sustituido por el grupo ácido carboxílico C-terminal presente en el aminoácido nativo. En una realización adicional, el péptido de SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48 se modifica adicionalmente por la adición de la secuencia de SEQ ID NO: 21 al extremo carboxi terminal del péptido.

30 **[0080]** En una realización adicional, se han desarrollado análogos de glucagón en los que se han eliminado los cinco primeros aminoácidos del glucagón natural, el grupo amino del aminoácido N-terminal (fenilalanina) ha sido sustituido por un grupo hidroxilo (es decir, el primer aminoácido es ácido fenil láctico) y las cadenas laterales de uno o más pares de aminoácidos seleccionados entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28 están unidos entre sí, estabilizando así la hélice alfa del análogo de glucagón.

35 **[0081]** Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 que se modifica mediante una sustitución del residuo serina en la posición 11 de la SEQ ID NO: 2 (posición 16 según la numeración de aminoácidos de glucagón natural) por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, treonina o glicina. Según una realización, el residuo de serina en la posición 11 de la SEQ ID NO: 2 está sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, y en una realización el residuo de serina está sustituido por ácido glutámico. Según una realización el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 38.

45 **[0082]** En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 en el que se forma un puente intramolecular entre dos cadenas laterales de aminoácidos para estabilizar la estructura tridimensional del extremo carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 2. Más particularmente, las cadenas laterales de uno o más aminoácidos seleccionados de los pares de aminoácidos 7 y 11, 11 y 15, 15 y 19 o 19 y 23 de la SEQ ID NO: 2 están unidos entre sí, estabilizando así la hélice alfa del análogo de glucagón. Las dos cadenas laterales pueden estar unidas entre sí a través de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas (tales como la formación de puentes salinos), o por enlaces covalentes. Según una realización, el tamaño del enlazador es de 7-9 átomos, y en una realización, el tamaño del enlazador es de 8 átomos. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8. En una realización, el aminoácido C-terminal del antagonista/agonistas de GLP-1 tiene un grupo amida que sustituye el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural.

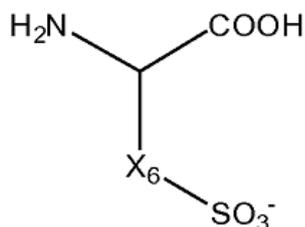
55 **[0083]** Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente de unión que tiene siete átomos incluyen Orn-Glu (lactama); Lys-Asp (lactama); o Homoser-Homoglu (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de ocho átomos incluyen Lys-Glu (lactama); Homolys-Asp (lactama); Orn-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe- Asp (lactama); o Tyr-Asp (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de nueve átomos incluyen Homolys-Glu (lactama); Lys-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe-Glu (lactama); o Tyr-Glu (lactona). Cualquiera de las cadenas laterales de estos aminoácidos puede estar sustituida con grupos químicos adicionales, siempre y cuando la estructura tridimensional de la hélice alfa no se interrumpa. Un experto en la técnica puede imaginar emparejamientos alternativos o análogos o derivados de aminoácidos alternativos que crearían una estructura estabilizadora de tamaño similar y efecto deseado. Por ejemplo, un puente disulfuro homocisteína-homocisteína tiene 6 átomos de longitud y puede ser modificado adicionalmente para proporcionar el efecto deseado. Incluso sin enlace covalente, los emparejamientos de aminoácidos descritos anteriormente o emparejamientos similares que un experto en la técnica puede imaginar también pueden proporcionar estabilidad añadida a la hélice alfa a través de

enlaces no covalentes, por ejemplo, mediante la formación de puentes salinos o interacciones de puentes de hidrógeno.

[0084] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 donde el análogo comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9. En una realización, la estructura tridimensional del extremo carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 9 se estabiliza mediante la formación de enlaces covalentes entre las cadenas laterales del péptido. En una realización, dos cadenas laterales de aminoácidos están unidas entre sí para formar un anillo de lactama. El tamaño del anillo de lactama puede variar dependiendo de la longitud de las cadenas laterales de aminoácidos, y en una realización, la lactama está formada mediante la unión de la cadena lateral de un aminoácido de lisina a una cadena lateral de ácido glutámico. En una realización, el aminoácido C-terminal del antagonista/agonistas de GLP-1 tiene un grupo amida que sustituye el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo.

[0085] El orden del enlace amida en el anillo de lactama se puede invertir (por ejemplo, un anillo de lactama se puede formar entre las cadenas laterales de Lys12 y Glu16 o, alternativamente, entre Glu12 y Lys16). Según una realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 9 en el que al menos un anillo de lactama se forma entre las cadenas laterales de un par de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en pares de aminoácidos 7 y 11, 11 y 15, 15 y 19 o 19 y 23 de la SEQ ID NO: 9. En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 en el que el agonista de péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, comprendiendo dicha secuencia adicionalmente un puente de lactama intramolecular formado entre las posiciones de aminoácidos 7 y 11, o entre las posiciones de aminoácidos 11 y 15, o entre las posiciones de aminoácidos 15 y 19 de la SEQ ID NO: 10. En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 en el que el péptido comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 11, comprendiendo dicha secuencia adicionalmente un puente de lactama intramolecular formado entre las posiciones de aminoácidos 7 y 11, o entre las posiciones de aminoácidos 11 y 15 de la SEQ ID NO: 11. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 17.

[0086] Se proporcionan antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 adicionales que comprenden derivados de SEQ ID NO: 5, en los que el ácido aspártico en la posición 10 de la SEQ ID NO: 5 (posición 15 de glucagón natural) ha sido sustituido por ácido glutámico, un aminoácido de la estructura general:



en el que X_6 es alquilo C_1-C_3 , alquenoilo C_2-C_3 o alquinoilo C_2-C_3 , y en una realización, X_6 es alquilo C_1-C_3 , y en otra realización, X_6 es alquilo C_2 . En una realización, se proporciona un derivado de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 9 en el que la posición 10 de la SEQ ID NO: 9 (posición 15 de glucagón natural) está sustituido por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico y ácido homoglutámico. En otra realización, la posición 10 de la SEQ ID NO: 9 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico o ácido homocisteico. En una realización, se proporciona un derivado de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 en el que la posición 10 de la SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico y ácido homoglutámico. En una realización, el aminoácido C-terminal del antagonista/agonistas de GLP-1 tiene un grupo amida que sustituye el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo.

[0087] El antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se puede modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras que se conserva la actividad de antagonista de glucagón y la actividad agonista de GLP-1. La introducción de grupos hidrófilos en las posiciones correspondientes a las posiciones 12, 15, 16, 19 y 24 del péptido de SEQ ID NO: 5, o en las posiciones 12, 16, 19 o 24 del péptido de SEQ ID NO: 6 puede mejorar la solubilidad de los péptidos resultantes en soluciones que tienen un pH fisiológico, mientras que los compuestos originales conservan la actividad de antagonista de glucagón y la actividad agonista de GLP. Por lo tanto, en una realización, los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en el presente documento se modifican adicionalmente para comprender uno o más grupos hidrófilos unidos covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 12, 15, 16, 19 y 24 del péptido de SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6. En una realización adicional, las cadenas laterales de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos 16 y 19 de la SEQ ID NO: 5 o SEQ ID NO: 6 se unen covalentemente a grupos hidrófilos y, en una realización, el grupo hidrófilo es polietilenglicol (PEG).

5 [0088] En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, o SEQ ID NO: 8, en el que dicho péptido comprende un anillo de lactama formado entre las cadenas laterales de los aminoácidos 7 y 11 de SEQ ID NO: 5, entre 11 y 15 para la SEQ ID NO: 6, entre las posiciones 15 y 19 de SEQ ID NO: 7 y entre las posiciones 19 y 24 de SEQ ID NO: 8, cada una de dichas secuencias estando modificadas adicionalmente para comprender un grupo hidrófilo covalentemente unido al péptido. Más particularmente, en una realización, cada uno de los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 son lactama son modificados mediante la unión covalente de una cadena de polietilenglicol. Por ejemplo, para el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la SEQ ID NO: 5, el péptido está pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 12, 15, 16, 19 y 24; para el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la SEQ ID NO: 6, el péptido está pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 12, 16, 19 y 24; para el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 7, el péptido está pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 11, 12, 16 y 24; para el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la SEQ ID NO: 8, el péptido está pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 11, 12, 15 y 16. Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48 en el que el péptido está pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 12, 16, 19 y 24, con relación a SEQ ID NO: 47 o SEQ ID NO: 48.

20 [0089] En una realización, un aminoácido del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 está sustituido por al menos un residuo de cisteína, en el que la cadena lateral del residuo de cisteína se modifica adicionalmente con un reactivo que reacciona con tiol, incluyendo, por ejemplo, maleimido, vinil sulfona, 2-piridilitio, haloalquilo, y haloacilo. Estos reactivos que reaccionan con tiol pueden contener grupos carboxi, ceto, hidroxilo y éter, así como otros restos hidrófilos, tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, un aminoácido del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 está sustituido por lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina sustituyente se modifica adicionalmente utilizando reactivos que reaccionan con amina, tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc) de ácidos carboxílicos o aldehídos de restos hidrófilos, tales como polietilenglicol. Según una realización, el residuo de lisina correspondiente a la posición 7 del péptido de SEQ ID NO: 5 está sustituido por arginina y una sola sustitución de lisina está insertada para uno de los aminoácidos correspondientes a la posición 12, 15, 16, 19 y 24 de la SEQ ID NO: 5.

35 [0090] En otra realización, el residuo de metionina correspondiente a la posición 22 de los péptidos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento se cambia a leucina o norleucina para evitar la degradación oxidativa del péptido.

40 [0091] El antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento también abarcan sustituciones de aminoácidos en las posiciones que se sabe que no son críticas para la función del análogo de glucagón. En una realización, las sustituciones son sustituciones de aminoácidos conservativas en uno, dos o tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22, 23 o 24. En una realización, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 o 29 del péptido de glucagón natural, y más particularmente, en la posición 21 y/o 24 con respecto al glucagón natural están sustituidos por cisteína o lisina, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de cisteína o lisina sustituido.

45 [0092] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 9, modificada adicionalmente por una o más sustituciones de aminoácidos en posiciones correspondientes a las posiciones 11, 12, 15, 16, 19 y/o 24 del péptido (incluyendo por ejemplo la sustitución por cisteína), en el que la sustitución de aminoácidos comprende un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo, por ejemplo, PEG. El glucagón natural puede estar sustituido con un aminoácido de origen natural o sintético (de origen no natural). Los aminoácidos sintéticos o de origen no natural se refieren a aminoácidos que no se producen naturalmente *in vivo* pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas aquí. En una realización se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 9 y comprende además una cadena de polietileno unido a la posición 16 o 19 del péptido. En una realización adicional, el C-terminal del análogo de glucagón se modifica para sustituir el grupo ácido carboxílico por un grupo amida.

55 [0093] En aquellas realizaciones en donde el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 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.

65 [0094] En una realización, el antagonista del glucagón/agonista de GLP-1 pegilado comprende un péptido que

consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 en el que la cadena de polietilenglicol está unida a un aminoácido seleccionado entre las posiciones 11, 12, 15, 16, 19 y 24 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51, y el peso molecular de la cadena de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización, el antagonista del glucagón/agonista de GLP-1 pegilado comprende un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 en el que la cadena de polietilenglicol está unida al aminoácido en la posición 16 o 19 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51, y el peso molecular de la cadena de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización adicional, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 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/agonista de GLP-1 pegilado comprende la secuencia SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 en el que una cadena de polietilenglicol está unida al aminoácido en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 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/agonista de GLP-1 que comprende un análogo de glucagón seleccionado del grupo que consiste en:

R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 39)

R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 13),

R₁-Phe-Thr-Ser-Tyr-Xaa-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 14) y

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

en la que Xaa en la posición 4 = ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico, Xaa en la posición 10 = Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homocisteico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 es Asp, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina y Xaa en la posición 19 es Gln, Cys, Orn, homocisteína y acetil fenilalanina, Xaa en la posición 22 = Met, Leu o Nle, R₁ es OH o NH₂, y R₂ es Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Ser Xaa (SEQ ID NO: 50; en donde Xaa es Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina), COOH o CONH₂, en el que el péptido está opcionalmente pegilado en la posición 16 de la SEQ ID NO: 13, la posición 19 de la SEQ ID NO: 14 y en las posiciones 16 y 19 de SEQ ID NO: 12. En una realización, la Thr en la posición 24 de la SEQ ID NOs: 12-14 y 39 está sustituida por Gly. Según una realización, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, en la que R₁ es OH. Según una realización, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, en la que R₁ es OH y R₂ es CONH₂. Según una realización, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 14, en la que R₁ es OH, R₂ es CONH₂ y la treonina en la posición 24 está sustituida por glicina.

[0096] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 en el que una proteína plasmática se ha unido covalentemente a una cadena lateral de aminoácido del péptido para mejorar la solubilidad, estabilidad y/o la farmacocinética del análogo de glucagón. Por ejemplo, la albúmina sérica puede unirse covalentemente al antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 presentados en este documento. En una realización, la proteína de plásmido se une covalentemente a un aminoácido correspondiente a la posición 12, 15, 16, 19 o 24 del péptido de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 5. Más particularmente, en una realización, la proteína de plásmido se une a un aminoácido correspondiente a la posición 16 o 19 del análogo de glucagón, donde el derivado comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o la proteína de plasma está unido en la posición 16 de la SEQ ID NO: 13, la posición 19 de la SEQ ID NO: 14 y en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 12.

[0097] 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/agonista de GLP-1 descrito en este documento para mejorar la solubilidad, la estabilidad y/o la farmacocinética del análogo de glucagón. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que representa la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina puede estar unida covalentemente a la posición 12, 15, 16, 19, 21 o 24 del péptido de SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 51 o SEQ ID NO: 5. Más particularmente, en una realización, la proteína de plásmido se une a un aminoácido correspondiente a la posición 16 o 19 del análogo de glucagón, en el que el análogo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, o la parte Fc está unida en la posición 16 para el derivado que comprende la SEQ ID NO: 13, la posición 19 para el derivado que comprende la SEQ ID NO: 14 y en las posiciones 16 y 19 para el derivado que comprende la SEQ ID NO: 12. La parte Fc es típicamente la aislada de IgG, pero el fragmento peptídico Fc de cualquier inmunoglobulina debe funcionar de forma equivalente.

[0098] La presente descripción también abarca otros conjugados en los que los péptidos de glucagón aquí descritos están unidos, opcionalmente a través de un enlace covalente y, opcionalmente, a través de un enlazador, a un conjugado. La unión puede llevarse a cabo mediante enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas, tales como interacciones electrostáticas, de hidrógeno, iónicas, de van der Waals, o hidrófobas o hidrófilas. Se puede utilizar una variedad de sistemas de acoplamiento no covalentes, incluyendo biotina-avidina, ligando/receptor,

enzima/sustrato, ácido nucleico/proteína de unión a 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.

5 **[0099]** Los conjugados de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, un péptido o polipéptido heterólogo (incluyendo, por ejemplo, una proteína de plasma), un agente de reconocimiento, una inmunoglobulina o parte de la mismas (por ejemplo, región variable, CDR, o región Fc), un marcador de diagnóstico, tal como un radioisótopo, fluoróforo o un 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 descrito en este documento y una proteína de plasma, en donde la proteína de plasma se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas. En una realización, el resto de proteína de plasma del conjugado es albúmina o transferrina. En algunas realizaciones, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, 2 a 10 átomos, 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 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 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, el conjugado completo puede ser una proteína de fusión. Tales 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. Tales proteínas de fusión pueden, alternativamente, producirse mediante procedimientos de ingeniería genética recombinante conocidas para un experto en la técnica.

10 **[0100]** La secuencia Asp-Ser en la posición 15-16 de glucagón natural ha sido identificado como un dipéptido único 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 natural puede escindirse 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 de la preformulación acuosa de glucagón y sus análogos relacionados. Se ha observado que la sustitución química selectiva del Asp en la posición 15 de glucagón natural por Glu elimina prácticamente la escisión química del enlace peptídico 15-16.

15 **[0101]** Por consiguiente, se espera que los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento pueden modificarse de manera similar para disminuir su susceptibilidad a la escisión química prematura en tampones acuosos. Según una realización, los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para mejorar su estabilidad en soluciones acuosas mediante la sustitución del aminoácido aspártico natural, situado en la posición 15 correspondiente de glucagón natural, 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 de los antagonistas de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 puede sustituirse 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: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 se sustituye por ácido glutámico. Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que tiene una estabilidad mejorada en soluciones acuosas en donde el antagonista comprende una secuencia modificada de la SEQ ID NO: 9, en el que la modificación comprende la sustitución del Asp en la posición 10 de la SEQ ID NO: 9 por Glu. En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 está amidado.

20 **[0102]** Según una realización, el aumento de la estabilidad por medio de la reducción de la degradación del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 descrito en este documento también puede lograrse mediante la sustitución de la serina en la posición 16 (según la numeración de glucagón natural) 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 de glucagón natural) está sustituida por ácido glutámico.

25 **[0103]** Los solicitantes también han descubierto que el glucagón natural puede modificarse mediante la introducción de carga en su extremo carboxilo para mejorar la solubilidad del péptido, a la vez que conserva las propiedades agonistas del péptido. La solubilidad mejorada permite 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 análogos de glucagón.

30 **[0104]** Los solicitantes prevén que los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 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), a la vez que conserva las actividades antagonistas de glucagón y GLP-1 de la proteína parental. Por consiguiente, una realización se refiere a un antagonista de glucagón/GLP-1 de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 que ha sido modificado adicionalmente con respecto a los aminoácidos nativos presentes en las posiciones 6-29 del glucagón de tipo natural (SEQ ID NO: 1) para añadir carga al péptido mediante la sustitución de aminoácidos nativos no cargados por aminoácidos cargados, o la adición de aminoácidos cargados al extremo carboxilo. Según una realización, de uno a tres de los aminoácidos nativos no cargados del antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento se sustituyen 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 en particular, los solicitantes han descubierto que sustituyendo el aminoácido natural correspondiente a la posición 28 y/o 29 (en relación con el glucagón natural) por aminoácidos cargados, y/o la adición de uno o dos aminoácidos cargados en el extremo carboxilo del péptido, mejora la solubilidad y la estabilidad del análogo de glucagón en soluciones acuosas a pH fisiológicamente relevantes (es decir, un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5). Por consiguiente, dichas modificaciones del antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento se prevé que tienen un efecto similar sobre la solubilidad en soluciones acuosas, particularmente a un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, a la vez que se conserva la actividad biológica del péptido parental.

[0105] Según una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 se modifica mediante la sustitución del aminoácido nativo en la posición 23 y/o 24 de estas secuencias 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) al extremo carboxilo del péptido. En una realización alternativa, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 se modifica mediante la sustitución del aminoácido nativo en la posición 24 de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 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 mejor solubilidad y estabilidad en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 con la condición de que al menos un aminoácido en la posición, 23, o 24 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 se sustituye por un aminoácido ácido y/o se añade un aminoácido ácido adicional en el extremo carboxilo de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51. En una realización, los aminoácidos ácidos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico.

[0106] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que presentan una solubilidad y estabilidad mejoradas en el que el antagonista comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19. Según una realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 16 o SEQ ID NO: 17. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20, con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 23 de SEQ ID NO: 20 es asparagina y el aminoácido en la posición 24 de la SEQ ID NO: 20 es treonina, el péptido comprende además uno o dos aminoácidos, seleccionados independientemente del grupo que consiste en Asp y Glu, añadido al extremo carboxilo del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1.

[0107] Según una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51. En una realización, la posición 4 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico, y en una realización, la posición 4 es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico, y en una realización adicional, la posición 4 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 es ácido aspártico o ácido glutámico, y en una realización, la posición 4 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 es ácido aspártico. En una realización, se proporciona un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51, en la que la posición 4 de la SEQ ID NO: 15 es ácido aspártico y la posición 10 de SEQ ID NO: 15 es ácido glutámico. En una realización adicional, el aminoácido C-terminal de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 se modifica para sustituir el grupo ácido carboxílico nativo por un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster.

[0108] El presente documento también abarca péptidos de fusión de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, en los que un segundo péptido se ha fusionado con el extremo C-terminal del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. Más particularmente, el péptido de fusión puede comprender un péptido antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 que comprende además una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 50 (GPSSGAPPPSX), SEQ ID NO: 26 (KRNRNNIA) y SEQ ID NO: 27 (KRNR) unida al aminoácido 24 del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. En una realización, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) está unida al aminoácido 24 del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de la SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 a través de un enlace peptídico. En otra realización, el péptido de fusión comprende un péptido de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido carboxi terminal del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. En una

realización adicional, el extremo C-terminal está modificado para sustituir el grupo ácido carboxílico por un grupo amida. En una realización, se proporciona un dímero de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende dos secuencias seleccionadas independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido carboxi terminal del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1.

[0109] En una realización adicional, un péptido de fusión de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 está opcionalmente pegilado. En una realización, se proporciona un péptido de fusión de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, en el que la parte de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 del péptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, en el que la secuencia de SEQ ID NO: 21 se fusiona al extremo carboxilo de la parte del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, 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, el segmento de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 de dicho péptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14, 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 otra realización, el péptido de fusión de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46, 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 está modificado para sustituir el grupo ácido carboxílico por un grupo amida.

[0110] En algunas realizaciones, los antagonistas de glucagón/agonista de GLP-1 se modifican adicionalmente por truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos del extremo C-terminal del péptido glucagón (es decir, el truncamiento de los aminoácidos en la posición 29 o en las posiciones 28 y 29 del glucagón natural) sin afectar a la actividad y/o la potencia en los receptores de glucagón y GLP-1. En este sentido, el antagonista de glucagón descrito aquí puede consistir esencialmente en 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, o 6-28 del péptido de glucagón natural (SEQ ID NO: 1) con una o más modificaciones que dan lugar a actividad antagonista de glucagón tal como se describe en el presente documento.

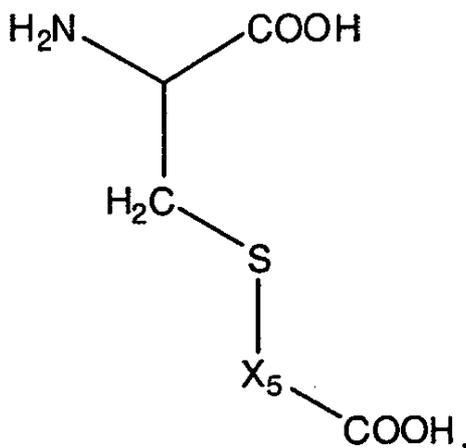
[0111] En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se modifica adicionalmente para comprender uno o más aminoácidos de GLP-1 natural mediante sustitución del residuo o residuos de glucagón natural en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Por ejemplo, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 2, 3, 17, 18, 21, 23, y 24 (según la numeración de aminoácidos de glucagón natural). En una realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se modifica mediante una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Ser2 se sustituye por Ala, Gln3 se sustituye por Glu, Arg17 se sustituye por Gln, Arg en la posición 18 se sustituye por Ala, Asp en la posición 21 se sustituye por Glu, Val en la posición 23 se sustituye por Ile, y Gln en la posición 24 se sustituye por Ala (las posiciones de aminoácidos están en conformidad con la secuencia de glucagón natural). En una realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se modifica mediante la sustitución de Ser2 por Ala y Gln3 por Glu (según la numeración de aminoácidos de glucagón natural). En otra realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se modifica con todas las siguientes sustituciones de aminoácidos: Arg17 se sustituye por Gln, Arg en la posición 18 se sustituye por Ala, Asp en la posición 21 se sustituye por Glu, Val en la posición 23 se sustituye por Ile, y Gln en la posición 24 se sustituye por Ala (numeración de aminoácidos según el glucagón natural). En todavía otra realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se modifica para comprender simplemente Glu en la posición 21 (según la numeración de SEQ ID NO: 1). Por consiguiente, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: el 60-70, 73-78, 80-88, 90-96, 103, 104, 106, y 114-118, o que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos 2-6 de la Tabla 13, Péptidos 1-8 de la Tabla 14, y los péptidos 2-6, 8, y 9 de la Tabla 15.

[0112] En una realización específica, el antagonista del glucagón/agonista de GLP-1 descrito anteriormente que comprende PLA se modifica para comprender un oxi derivado de PLA, tal como, por ejemplo, un éster de PLA o un éter de PLA. Por ejemplo, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 2, 5-20, 22-25, 32-36, 38, 39, 45, 46, y 51, en el que PLA está unido a través de un enlace éster o éter a un aminoácido, péptido, polímero, grupo acilo, o grupo alquilo. El aminoácido, péptido, polímero, grupo acilo, o grupo alquilo pueden ser cualquiera de los descritos en este documento. En el caso de que el PLA esté unido a través de un enlace éster a un aminoácido o péptido, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 puede considerarse como un depsipéptido.

[0113] También, en otra realización específica, el antagonista del glucagón/agonista de GLP-1 descrito anteriormente que carece de PLA se modifica para comprender al menos un enlace éster o enlace éter entre dos aminoácidos consecutivos que son N-terminal al aminoácido en la posición 7 (según la numeración de glucagón natural). En una realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende al menos un

enlace éster o éter entre los dos aminoácidos consecutivos. En una realización más específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende los 6 aminoácidos N-terminales de SEQ ID NO: 1 y dos aminoácidos consecutivos de los 6 aminoácidos N-terminales están unidos a través de un enlace éster o éter.

- 5 **[0114]** También se proporcionan en el presente documento un péptido o conjugado del mismo que comprende (1) una hélice alfa estabilizada a través de medios descritos en este documento (por ejemplo, a través de un puente intramolecular, o la incorporación de uno o más alfa-aminoácidos, aminoácidos alfa-di-sustituidos, o un aminoácido ácido en la posición 16 (según la numeración de SEQ ID NO: 1), o una combinación de los mismos; (2) una amida o éster C-terminal en lugar de un carboxilato C-terminal, y (3) una estructura general de A-B-C, en la que A se selecciona del grupo que consiste en
- 10 (i) PLA;
(ii) un oxi-derivado 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;
- 15 en el que B representa los aminoácidos p a 26 de la SEQ ID NO: 1, en la que p 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 con ácido sulfónico de Cys, ácido homoglutámico, ácido β -homoglutámico, o un derivado con alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:

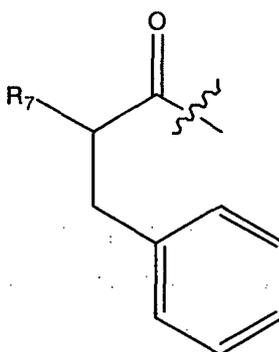


- 45 en la que X_5 es alquilo C_1-C_4 , alqueno C_2-C_4 o alquino C_2-C_4 .
(v) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) por un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo a través de un enlace éster, éter, 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) Arg en la posición 17 se sustituye por Gln, Arg en la posición 18 se sustituye por Ala, Asp en la posición 21 se sustituye por Glu, Val en la posición 23 se sustituye por Ile, y Gln en la posición 24 se sustituye por Ala (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1);
(x) Ser en la posición 16 se sustituye por Glu, Gln en la posición 20 se sustituye por Glu, o Gln en la posición 24 se sustituye por Glu (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1);
en la que C se selecciona del grupo que consiste en:
(vii) X;
(viii) X-Y;
55 (ix) X-Y-Z; y
60 (x) X-Y-Z-R10,
- 65

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: 21, 26, 27 y 50.

5 **[0115]** 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.

10 **[0116]** 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:



30 **Fórmula IV**

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

35 **[0117]** 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'-carbonyldiimidazol (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-oxitris(dimetilamino) fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol 1-il-oxitripirrolidino fosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio (HATU), y hexafluorofosfato de o-benzotriazol-N,N',N'-tetrametil-uronio (HBTU).

45 **[0118]** 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.

50 **[0119]** Generalmente, el grupo químico de R₁₁ es aquel que no disminuye la actividad del péptido. En algunas realizaciones, el grupo químico aumenta la actividad, estabilidad y/o solubilidad del péptido.

55 **[0120]** 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.

60 **[0121]** 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 péptido, de manera que el péptido comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) aminoácidos N-terminales al residuo PLA. Por ejemplo, el péptido puede comprender PLA en la posición n, en el que n es 2, 3, 4, 5, o 6 del péptido.

65 **[0122]** 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 péptido puede comprender en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 52-

56, en las que PLA está unido a treonina mediante un enlace éster:

SEQ ID NO: 52 His-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 53 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA

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

5 SEQ ID NO: 55 Gly-Thr-PLA

SEQ ID NO: 56 Thr-PLA

10 **[0123]** 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 péptido 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 péptido 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/agonista 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 péptido comprende PLA como aminoácido en la posición 4, 5, ó 6, el aminoácido en la posición 3 del péptido puede ser ácido glutámico, en oposición al residuo de glutamina nativo del glucagón nativo. En una realización de ejemplo de la invención, el péptido comprende en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 57-59.

20 **[0124]** Con respecto a los péptidos 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 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, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo alquicelulosa, hidroxialquicelulosas, 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, carboxiletil 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.

35 **[0125]** 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, alquileno, 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.

45 **[0126]** 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).

55 **[0127]** 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, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil butilcelulosa, hidroxipropil pentilcelulosa, metil celulosa, etil celulosa (Ethocel), hidroxietil celulosa, diversas alquicelulosas e hidroxialquicelulosas, 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 polioxietileno y polioxipropileno, anhídrido de polimetilviniléter co-maleico, carboximetilamida, co-polímero de metacrilato de potasio y divinilbenceno, polioxietilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

[0128] En una realización específica, el polímero es un polialquilenglicol, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

[0129] 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).

[0130] 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.

[0131] 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.

[0132] En una realización alternativa, el péptido que comprende la estructura general de A-B-C 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 de A 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.

[0133] El péptido de A 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 de A 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 de A 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 de A puede comprender en la posición 1 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 de A 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, el aminoácido en la posición 3 del péptido de A puede ser ácido glutámico, en oposición al residuo de glutamina nativo del glucagón nativo. Por consiguiente, el péptido de estructura general de A-B-C puede comprender una secuencia de aminoácidos de:

Xaa₁-Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 107);

Xaa₂-Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 108); o

Xaa₃-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 109);

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.

[0134] Con respecto al péptido 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.

[0135] 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 conservativas.

[0136] 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

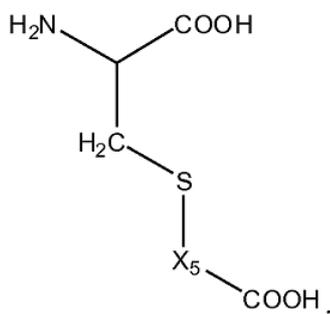
combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en (iv), (vii), (viii) y (ix), además de (v) y (vi).

[0137] Tal como se describe en el presente documento, el péptido que comprende la estructura general A-B-C puede comprender uno o más aminoácidos cargados en el extremo C-terminal, por ejemplo, como Y y/o Z, tal como se describe en el presente documento. Alternativamente o adicionalmente, el péptido que comprende la estructura general A-B-C puede comprender además uno o dos aminoácidos cargados C-terminales a Z, cuando C comprende X-Y-Z. Los aminoácidos cargados pueden ser, por ejemplo, uno de Lys, Arg, His, Asp, y Glu. En una realización específica, Y es Asp.

[0138] En una realización, el péptido que comprende la estructura general A-B-C comprende un grupo hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 1, 16, 20, 21, o 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1), o en el residuo N- o C-terminal del péptido que comprende la estructura general A-B-C. En una realización específica, el grupo hidrófilo está unido a un residuo de Cys del péptido que comprende la estructura general A-B-C. En este sentido, el aminoácido en la posición 16, 21, 24, o 29 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1) puede estar sustituido por un residuo Cys. Alternativamente, un residuo de Cys que comprende un grupo hidrófilo puede añadirse al extremo C-terminal del péptido que comprende la estructura general A-B-C como la posición 30 o la posición 40, por ejemplo, cuando el péptido que comprende la estructura general A-B-C comprende una extensión C-terminal (posiciones según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1). Alternativamente, el grupo hidrófilo puede estar unido al PLA del péptido que comprende la estructura general A-B-C a través del grupo hidroxilo de PLA. El grupo hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol.

[0139] En un aspecto específico, el péptido que comprende la estructura general A-B-C comprende una hélice alfa estabilizada en virtud de la incorporación de un puente intramolecular. En una realización, el puente intramolecular es un puente de lactama. El puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 9 y 12, los aminoácidos en las posiciones 12 y 16, los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, los aminoácidos en las posiciones 20 y 24, o los aminoácidos en las posiciones 24 y 28 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1). En una realización específica, los aminoácidos en las posiciones 12 y 16 o en las posiciones 16 y 20 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1) están unidos a través de un puente de lactama. Se contemplan otras posiciones del puente de lactama.

[0140] Adicional o alternativamente, el péptido que comprende la estructura general A-B-C puede comprender un aminoácido alfa, alfa-disustituido en, por ejemplo, cualquiera de las posiciones 16, 20, 21, o 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1). En una realización, el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB. En un aspecto específico, AIB se encuentra en la posición 16 (según la numeración de SEQ ID NO: 1). Alternativa o adicionalmente, el péptido que comprende la estructura general A-B-C puede modificarse para comprender un aminoácido ácido en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1), cuya modificación mejora la estabilidad de la hélice alfa. El aminoácido ácido, en una realización, es un aminoácido que comprende un ácido sulfónico de cadena lateral o un ácido carboxílico de cadena lateral. En una realización más específica, el aminoácido ácido se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, ácido homoglutámico, un derivado con ácido sulfónico de Cys, ácido cisteico, ácido homocisteico, Asp, y un derivado alquilado de Cys que tiene la estructura de



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

[0141] En una realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 60-70, 73-78, 80-88, 90-96, 103, 104, 106, y 114-118, o que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos 2-6 de la Tabla 13, Péptidos 1-8 de la Tabla 14, y los péptidos 2-6, 8, y 9 de la Tabla 15.

[0142] En una realización, el péptido que comprende la estructura general A-B-C es un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. En una realización específica, el péptido muestra al menos aproximadamente 50% de

agonismo máximo alcanzado por GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 y al menos aproximadamente 50% de inhibición de la respuesta máxima alcanzada por glucagón natural en el receptor de glucagón. En otra realización específica, el péptido muestra al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o aproximadamente 100% del agonismo máximo alcanzado por GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. Alternativamente o adicionalmente, el péptido puede mostrar al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o aproximadamente 100% de inhibición de la respuesta máxima alcanzada por glucagón natural en el receptor de glucagón.

[0143] En algunas realizaciones, se proporciona un péptido con actividad de antagonista de glucagón y agonista de GLP-1 (por ejemplo, un antagonista de glucagón, agonista de GLP-1) o conjugado del mismo, que comprende:

(1) modificaciones que confieren actividad antagonista de glucagón, incluyendo, pero no limitado a:

(a) sustitución de Phe en la posición 6 por PLA (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural), opcionalmente con la supresión de 1 a 5 aminoácidos del extremo N-terminal del glucagón de tipo natural; o

(b) supresión de 2 a 5 aminoácidos del extremo N-terminal del glucagón de tipo natural; opcionalmente con sustitución de Asp en la posición 9 de glucagón de tipo natural por ácido glutámico, ácido homoglutámico o un derivado con ácido sulfónico de cisteína (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural);

y

(2) modificaciones que confieren actividad de agonista de GLP-1, incluyendo pero no limitado a:

(a) inserción o sustitución de aminoácido α,α -disustituido dentro de los aminoácidos 12 a 29 de glucagón de tipo natural, por ejemplo en uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural); o

(b) introducción de un puente intramolecular dentro de los aminoácidos 12-29 de glucagón de tipo natural, por ejemplo, un puente salino o un puente de lactama u otro tipo de enlace covalente; o

(c) sustitución del aminoácido en una o más de las posiciones 2, 3, 17, 18, 21, 23, o 24 (según la numeración de aminoácidos de glucagón natural) por el aminoácido correspondiente de GLP-1, por ejemplo Ser2 se sustituye por Ala, Gln3 se sustituye por Glu, Arg17 se sustituye por Gln, Arg en la posición 18 se sustituye por Ala, Asp en la posición 21 se sustituye por Glu, Val en la posición 23 se sustituye por Ile, y/o Gln en la posición 24 se sustituye por Ala; o

(d) otras modificaciones que estabilizan la estructura de hélice alfa alrededor de las posiciones de los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural; y

(3) otras modificaciones que mejoran la actividad agonista de GLP-1, por ejemplo,

(a) una amida o éster C-terminal en lugar de un carboxilato C-terminal; y opcionalmente

(4) una o más de las siguientes modificaciones:

(a) unión covalente a un grupo hidrófilo, tal como polietilenglicol, por ejemplo, en el extremo N-terminal, o en la posición 6, 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40 o en el aminoácido C-terminal; y/o

(b) acilación o alquilación; y opcionalmente

(5) una o más de las siguientes modificaciones adicionales:

(a) unión covalente de aminoácidos, al extremo N-terminal, por ejemplo, 1-5 aminoácidos al extremo N-terminal, opcionalmente a través de un enlace éster a PLA en la posición 6 (según la numeración de glucagón de tipo natural), opcionalmente junto con modificaciones en la posición 1 o 2, por ejemplo, tal como se describe aquí, que mejoran la resistencia a la escisión de DPP-11V;

(b) supresión de los aminoácidos en las posiciones 29 y/o 28, y, opcionalmente, la posición 27 (según la numeración de glucagón de tipo natural);

(c) unión covalente de aminoácidos al extremo C-terminal;

(d) sustituciones no conservativas, sustituciones conservativas, adiciones o supresiones, a la vez que se conserva la actividad deseada, por ejemplo, sustituciones conservativas en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29, sustitución de Tyr en la posición 10 por Val o Phe, sustitución de Lys en la posición 12 por Arg, sustitución de uno o más de estas posiciones por Ala;

(e) modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, mediante sustitución por ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico, lo que puede reducir la degradación; o modificación de la serina en la posición 16, por ejemplo, mediante sustitución de treonina, AIB, ácido glutámico o por otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o como alternativa por uno cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico, que también pueden reducir la degradación debido a la escisión del enlace Asp15-Ser16;

(f) modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, mediante sustitución por leucina o norleucina, para reducir la degradación oxidativa;

(g) modificación de Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, mediante sustitución por Ala o AIB, para reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln

(h) modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, mediante la sustitución por Glu, para reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar una succinimida cíclica intermedia seguido por isomerización a iso-aspartato;

(j) homodimerización o heterodimerización tal como se describen en el presente documento; y

(k) combinaciones de los anteriores.

[0144] Se entiende que cualquiera de las modificaciones dentro de la misma clase se pueden combinar entre sí y/o se combinan modificaciones de las diferentes clases. Por ejemplo, las modificaciones de (1)(a) se pueden combinar con (2)(a) y (3); (1)(a) se puede combinar con (2)(b), por ejemplo puente de lactama o puente salino, y (3); (1)(a) se puede combinar con (2)(c) y (3); (1)(b) se puede combinar con (2)(a) y (3); (1)(b) se puede combinar con (2)(b), por ejemplo puente de lactama o puente salino, y (3); (1)(b) se puede combinar con (2)(c) y (3); cualquiera de los anteriores se pueden combinar con (4)(a) y/o (4)(b); y cualquiera de los anteriores se pueden combinar con cualquiera de (5)(a) a (5)(k).

[0145] En realizaciones de ejemplo, el aminoácido α,α -disustituido AIB está sustituido en una, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21, o 24 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural).

[0146] En realizaciones de ejemplo, el puente intramolecular es un puente salino.

[0147] En otras realizaciones de ejemplo, el puente intramolecular es un enlace covalente, por ejemplo, un puente de lactama. En algunas realizaciones, el puente de lactama está entre los aminoácidos en las posiciones 9 y 12, los aminoácidos en las posiciones 12 y 16, los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, los aminoácidos en las posiciones 20 y 24, o los aminoácidos en las las posiciones 24 y 28 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1).

En realizaciones de ejemplo, la acilación o alquilación está en la posición 6, 10, 20 o 24 o en el extremo N-terminal o C-terminal (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) SEQ ID NO: 1).

[0148] En realizaciones de ejemplo, las modificaciones incluyen:

- (i) 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;
 - (ii) 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;
 - (iii) sustitución de Asn en la posición 28 por un aminoácido cargado;
 - (iv) sustitución de Asn en la posición 28 por un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico, y ácido homocisteico;
 - (v) sustitución en la posición 28 por Asn, Asp, o Glu;
 - (vi) sustitución en la posición 28 por Asp;
 - (vii) sustitución en la posición 28 por Glu;
 - (viii) sustitución de Thr en la posición 29 por un aminoácido cargado;
 - (ix) sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico, y ácido homocisteico;
 - (x) sustitución en la posición 29 por Asp, Glu o Lys;
 - (xi) sustitución en la posición 29 por Glu;
 - (xii) inserción de 1-3 aminoácidos cargados después de la posición 29;
 - (xiii) inserción después de la posición 29 de Glu o Lys;
 - (xiv) inserción después de la posición 29 de Gly-Lys o Lys-Lys;
- o sus combinaciones.

[0149] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente, que aumentan la actividad agonista del receptor de GLP-1, la actividad antagonista del receptor de glucagón, la solubilidad del péptido, y/o la estabilidad del péptido se pueden aplicar individualmente o en combinación.

[0150] Se cree que los péptidos y los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos son adecuados para cualquier uso que anteriormente se haya descrito para otros antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1. Por consiguiente, los análogos de glucagón 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/agonistas de GLP-1 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, los péptidos y antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en el presente documento se pueden 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.

[0151] El procedimiento de tratamiento de la hipoglucemia comprende las etapas de administrar los péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en el presente documento a un paciente usando cualquier vía

estándar de administración, incluyendo parenteral, tal como por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y la composición glucagón se preenvasa en una jeringa.

[0152] 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, los péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en el presente documento se administran 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: 21 (GPSSGAPPPS)) están unidos al extremo carboxilo de un péptido o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos 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 péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 50 unida al aminoácido del carboxi terminal (posición 24) del péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 y administrarse a individuos para inducir la pérdida de peso o ayudar en el mantenimiento del peso. Más particularmente, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25 y que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 50 unida al aminoácido del carboxi terminal (posición 24) del péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, se utiliza para suprimir el apetito e inducir la pérdida de peso/mantenimiento del peso. En una realización, el péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 administrado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) unida al aminoácido del carboxi terminal (posición 24) del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. En una realización, el procedimiento comprende administrar un péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46.

[0153] 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.

[0154] Los péptidos de glucagón descritos en este documento 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 (Diamicon); 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).

[0155] 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.

[0156] Los péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento 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 péptidos o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 descritos en este documento pueden administrarse a los pacientes para tratar el desgaste catabólico.

[0157] Las composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos o antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 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 péptidos o antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender los péptidos o antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 como el único componente farmacéuticamente activo, o los péptidos o antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 pueden combinarse con uno o más agentes activos adicionales. Según una realización, se proporciona una composición que comprende un péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 e insulina o análogo de insulina. Alternativamente, se proporciona una composición para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51 que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 50 unida al aminoácido 24 de SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 51, y un péptido anti-obesidad. Los péptidos anti-obesidad adecuados incluyen los descritos en las patentes de Estados Unidos 5.691.309, 6.436.435 o la solicitud de patente de Estados Unidos 20050176643.

[0158] Según una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los nuevos péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 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.

[0159] Todos los métodos terapéuticos, composiciones farmacéuticas, kits y otras realizaciones similares descritas en el presente documento contemplan que el uso del término péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 incluye todas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismas.

[0160] La PEGilación de péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 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 péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 modificados. Según una realización, se proporciona un péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 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 péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 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 péptido o antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 administrado.

[0161] En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, en el que la cadena lateral de uno o más residuos de aminoácido en la posición 16 o 19 del péptido se une covalentemente a una cadena de polietilenglicol, en el que el peso molecular total de la cadena o cadenas de PEG es mayor que aproximadamente 10.000 Daltons. En una realización, el peso molecular de la cadena o cadenas de PEG es mayor que 10.000 y menor o igual a 40.000 Daltons.

[0162] Los péptidos 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 pueden administrarse en combinación con insulina para amortiguar las acciones de la insulina y ayudar a mantener los niveles de glucosa en la sangre estable en los diabéticos. Los péptidos de glucagón modificados de la presente descripción se pueden coadministrar con la insulina como una sola composición, se pueden administrar simultáneamente como soluciones separadas, o alternativamente, la insulina y el péptido de glucagón modificado se pueden administrar en diferentes tiempos uno respecto al otro. En una realización, la composición que comprende la insulina y la composición que comprende el

péptido de glucagón modificado se administran dentro de 12 horas el uno del otro. La relación exacta del péptido de glucagón modificado con respecto a la insulina administrada dependerá en parte de la determinación de los niveles de glucagón del paciente, y puede determinarse mediante la experimentación de rutina.

5 **[0163]** Según una realización, se proporciona una composición que comprende insulina y un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado que comprende el péptido de SEQ ID NO: 13, en el que un residuo de aminoácido en la posición 16 de la SEQ ID NO: 13 se une 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, se proporciona una composición que comprende insulina y un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado o péptido pegilado que comprende el péptido de SEQ ID NO: 14, en el que un residuo de aminoácido en la posición 19 de la SEQ ID NO: 14 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 del glucagón/agonista de GLP-1 pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 12, en el que un residuo de aminoácido en posición 16 y 19 de la SEQ ID NO: 12 se une covalentemente a una cadena de polietilenglicol en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de polietileno se selecciona del intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Daltons. En otra realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO. 14, en el que la cadena de PEG unida covalentemente tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 10.000 Daltons, y en una realización se selecciona el peso molecular del PEG del intervalo de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

25 **[0164]** Según una realización el antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento se utilizan para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal. Este procedimiento tiene utilidad para los propósitos radiológicos y comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado, un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende una extensión C-terminal o un dímero de dichos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1.

30 **[0165]** La presente descripción también abarca multímeros de los péptidos o antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 modificados descritos en este documento. Dos o más de los análogos de glucagón pueden enlazarse entre sí usando agentes y procedimientos de unión estándar conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los dímeros se pueden formar entre dos péptidos o antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 modificados mediante el uso de agentes de reticulación tiol bifuncionales y reticulantes amina bifuncionales, en particular para antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 que han sido sustituidos (en las posiciones 16 o 19, por ejemplo) con residuos de cisteína, lisina, ornitina, homocisteína o acetil fenilalanina (por ejemplo, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 14). El dímero puede ser un homodímero o, alternativamente, puede ser un heterodímero. En una realización, se forma el dímero entre dos antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 seleccionados independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ DD NO: 25, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 48, 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, el enlace es un enlace disulfuro entre un residuo de Cys16 a Cys16, o una Cys19 a Cys19 o una Cys16 a Cys19, o una Cys24 a Cys24 o una Cys35 a Cys35 (para SEQ ID NO: 45 o SEQ ID NO: 46) de los respectivos péptidos de antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1.

45 **[0166]** Del mismo modo, puede formarse un dímero entre dos péptidos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 seleccionados independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 51, en el que el enlace se forma entre las posiciones de aminoácidos independientemente seleccionadas de las posiciones 11, 16, 19 y 35, en relación con la secuencia del antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1. Según una realización, se proporciona un dímero de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende dos antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, en el que los dos antagonistas están unidos entre sí por un enlace disulfuro a través de la posición de aminoácido 16 o 19 de la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 o SEQ ID NO: 19. En una realización, el dímero comprende un homodímero de dos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1. En otra realización el primer y segundo análogos de glucagón del dímero se seleccionan independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8.

60 **[0167]** Los análogos de glucagón o péptidos descritos en el presente documento se pueden proporcionar de acuerdo con una realización como parte de un kit. En una realización, se proporciona un kit para administrar un agonista de glucagón a un paciente en necesidad del mismo en el que el kit comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 modificado seleccionado del grupo que consiste en
65 1) un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19,

SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 51.

2) un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado, en el que una cadena de polietileno se une covalentemente a la posición 11, 12, 15, 16, 19 o 24 (en relación con la secuencia de aminoácidos del análogo) de un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 descrito en este documento, 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/agonista de GLP-1 descrito en el presente documento que comprende adicionalmente el péptido de SEQ ID NO: 21 fusionado al aminoácido terminal de dicho antagonista de glucagón/agonista de GLP-1; y

4) un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 pegilado, que comprende además una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 21 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 50 unidas al extremo carboxi terminal del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, en el que una cadena de polietileno se une covalentemente a la posición 11, 12, 15, 16, 19, 24 o 35 del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, además en el que la cadena de polietileno tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0168] En una realización, el kit se proporciona con un dispositivo para administrar la composición de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 o péptido 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. De acuerdo con una realización, el dispositivo del kit es un dispositivo de dispensación en aerosol, en el que la composición está preenvasada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización, el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización la composición de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 está preenvasada dentro de la jeringa.

[0169] Lo siguiente se aplica a los péptidos y antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento.

Estabilización de la estructura de la hélice alfa

[0170] La estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29, según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural, SEQ ID NO: 1) se puede llevar a cabo mediante, por ejemplo, la formación de un puente intramolecular covalente o no covalente, o sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12 a 29 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) por un aminoácido que estabiliza la hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido α,α -disustituido).

[0171] En algunas realizaciones, se forma un puente intramolecular entre dos cadenas laterales de aminoácidos para estabilizar la estructura tridimensional de la parte carboxi terminal (por ejemplo, los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) del péptido de glucagón. Las dos cadenas laterales de aminoácidos pueden enlazarse entre sí a través de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, tales como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes.

[0172] En algunas realizaciones, se forma el puente intramolecular entre dos aminoácidos que están 3 aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$, en el que i es cualquier número entero entre 12 y 25 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25) según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural. Más particularmente, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24 o 24 y 28 (pares de aminoácidos en los que $i = 12, 16, 20, \text{ o } 24$) de acuerdo a la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural están unidos entre sí y, por tanto, estabilizan la hélice alfa de glucagón. Alternativamente, i puede ser 17.

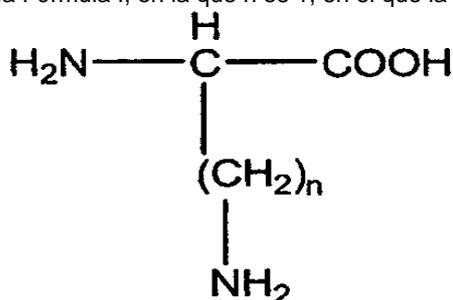
[0173] En algunas realizaciones específicas, en el que los aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$ están unidos por un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de alrededor de 8 átomos, o aproximadamente 7-9 átomos.

[0174] En otras realizaciones, se forma el puente intramolecular entre dos aminoácidos que están dos aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones j y $j + 3$, en el que j es cualquier número entero entre 12 y 26 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, y 26) según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural. En algunas realizaciones específicas, j es 17.

[0175] En algunas realizaciones específicas, en las que los aminoácidos en las posiciones j y $j + 3$ están unidos por un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 6 átomos, o aproximadamente de 5 a 7 átomos.

[0176] En aún otras realizaciones, se forma el puente intramolecular entre dos aminoácidos que están 6 aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones k y $k + 7$, en el que k es cualquier número entero entre 12 y 22 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, y 22) según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural. En algunas realizaciones específicas, k es 12, 13, o 17. En una realización de ejemplo, k es 17.

[0177] Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente de unión de seis átomos incluyen Orn y Asp, Glu y un ácido amino de la Fórmula I, en la que n es 2, y ácido homoglutámico y un ácido amino de la Fórmula I, en la que n es 1, en el que la Fórmula I es:



en la que n = 1 a 4

[Fórmula I]

[0178] Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente de unión que tiene siete átomos incluyen Orn-Glu (lactama); Lys-Asp (lactama); o Homoser-Homoglu (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de ocho átomos incluyen Lys-Glu (lactama); Homolys-Asp (lactama); Orn-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe- Asp (lactama); o Tyr-Asp (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de nueve átomos incluyen Homolys-Glu (lactama); Lys-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe-Glu (lactama); o Tyr-Glu (lactona). Cualquiera de las cadenas laterales de estos aminoácidos puede estar sustituida con grupos químicos adicionales, siempre y cuando la estructura tridimensional de la hélice alfa no se interrumpa. Un experto en la técnica puede imaginar emparejamientos alternativos o análogos o derivados de aminoácidos alternativos que crearían una estructura estabilizadora de tamaño similar y efecto deseado. Por ejemplo, un puente disulfuro homocisteína-homocisteína tiene 6 átomos de longitud y puede ser modificado adicionalmente para proporcionar el efecto deseado. Incluso sin enlace covalente, los emparejamientos de aminoácidos descritos anteriormente o emparejamientos similares que un experto en la técnica puede imaginar también pueden proporcionar estabilidad añadida a la hélice alfa a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, mediante la formación de puentes salinos o interacciones de puentes de hidrógeno.

[0179] El tamaño de un anillo de lactama puede variar dependiendo de la longitud de las cadenas laterales de aminoácidos, y en una realización la lactama está formada mediante la unión de las cadenas laterales de un aminoácido de lisina a una cadena lateral de ácido glutámico. Otras realizaciones de ejemplo (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) incluyen los siguientes emparejamientos, opcionalmente con un puente de lactama: Glu en la posición 12 con Lys en la posición 16; Lys nativa en la posición 12 con Glu en la posición 16; Glu en la posición 16 con Lys en la posición 20; Lys en la posición 16 con Glu en la posición 20; Glu en la posición 20 con Lys en la posición 24; Lys en la posición 20 con Glu en la posición 24; Glu en la posición 24 con Lys en la posición 28; Lys en la posición 24 con Glu en la posición 28. Como alternativa, el orden del enlace amida en el anillo de lactama se puede invertir (por ejemplo, un anillo de lactama se puede formar entre las cadenas laterales de Lys 12 y Glu 16 o alternativamente entre Glu 12 y Lys16).

[0180] Se puede utilizar puentes intramoleculares distintos de un puente de lactama para estabilizar la hélice alfa de los péptidos análogos de glucagón. En una realización, el puente intramolecular es un puente hidrófobo. En este caso, el puente intramolecular es opcionalmente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que son parte de la cara hidrofóbica de la hélice alfa del péptido análogo de glucagón. Por ejemplo, uno de los aminoácidos unidos por el puente hidrófobo puede ser el aminoácido en la posición 10, 14, y 18 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural).

[0181] En un aspecto específico, la metátesis de olefinas se utiliza para reticular uno o dos giros de la hélice alfa del péptido glucagón utilizando un sistema de reticulación de todos los hidrocarburos. El péptido de glucagón en este caso puede comprender aminoácidos alfa-metilados que lleva cadenas laterales olefinicas de longitud variable y configuradas, ya sea con estereoquímica R o S en las posiciones i e $i + 4$ o $i + 7$. Por ejemplo, la cara olefínica puede comprender $(\text{CH}_2)_n$, donde n es cualquier número entero entre 1 a 6. En una realización, n es 3 para una longitud de reticulación de 8 átomos. Los procedimientos adecuados para la formación de tales puentes intramoleculares se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891 hasta 5.892 (2000) y Walensky et al, Science 305: 1466-70 (2004). Alternativamente, el péptido de glucagón puede comprender residuos de Ser O-alilo localizados en los giros helicoidales adyacentes, que están puenteados entre sí a través de metátesis de cierre de anillo catalizada por rutenio. Tales procedimientos de reticulación se describen en, por ejemplo, Blackwell et al., Angew, Chem., Int. Ed. 37: 3281- 3284 (1998).

[0182] En otro aspecto específico, el aminoácido tiodialanina no natural, lantionina, que ha sido ampliamente adoptado como un peptidomimético de cistina, se utiliza para reticular un giro de la hélice alfa. Los procedimientos adecuados de ciclación a base de lantionina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Matteucci et al, Tetrahedron Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., J. Peptide Res. 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., J. Med. Chem. 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., J. Med. Chem. 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., Bull. Chem. Soc. Jpn. 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., J. Org. Chem. 36: 73-80 (1971); Goodman y Shao, Pure Appl. Chem. 68: 1303-1308 (1996); y Osapay y Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1599-1600 (1993).

[0183] En algunas realizaciones, grupos enlazadores de α , ω -diaminoalcanos, por ejemplo, 1,4-diaminopropano y 1,5-diaminopentano) entre dos residuos de Glu en las posiciones i e $i + 7$ se utilizan para estabilizar la hélice alfa del péptido de glucagón. Dichos grupos enlazadores conducen a la formación de un puente de 9 átomos de longitud o más, dependiendo de la longitud del grupo de enlazadores de diaminoalcano. Los procedimientos adecuados para la producción de péptidos reticulados con dichos grupos enlazadores se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Phelan et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997).

[0184] En aún otra realización aquí descrita, se utiliza un puente disulfuro para reticular uno o dos giros de la hélice alfa del péptido de glucagón. Alternativamente, se utiliza un puente disulfuro modificado en el que uno o ambos átomos de azufre se sustituyen por un grupo metileno que da lugar a una macrociclación isostérica para estabilizar la hélice alfa del péptido de glucagón. Los procedimientos adecuados para la modificación de péptidos con puentes disulfuro o ciclación a base de azufre se describen en, por ejemplo, Jackson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 9391-9392 (1991) y Rudinger y Jost, Experientia 20: 570-571 (1964).

[0185] En aún otra realización, la hélice alfa del péptido glucagón se estabiliza a través de la unión del átomo de metal por dos residuos de His o un par His y Cys posicionados en i y $i + 4$. El átomo de metal puede ser, por ejemplo, Ru (III), Cu (II), Zn (II), o Cd (II). Tales procedimientos de estabilización de hélice alfa a base de unión del metal son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Andrews y Tabor, Tetrahedron 55: 11711-11743 (1999); Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 1630-1632 (1990); y Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 9063- 9064 (1997).

[0186] La hélice alfa del péptido de glucagón alternativamente puede estabilizarse a través de otros medios de ciclación del péptido, cuyos medios se revisan en Davies, J. Peptide. Sci 9: 471-501 (2003). La hélice alfa puede estabilizarse a través de la formación de un puente de amida, puente de tioéter, puente de tioéster, puente de urea, puente de carbamato, puente de sulfonamida, y similares. Por ejemplo, un puente de tioéster se puede formar entre el extremo C-terminal y la cadena lateral de un residuo de Cys. Alternativamente, un tioéster se puede formar a través de cadenas laterales de aminoácidos que tienen un tiol (Cys) y un ácido carboxílico (por ejemplo, Asp, Glu). En otro procedimiento, un agente de reticulación, tal como un ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido subérico (ácido octanodioico), etc. puede introducir un enlace entre dos grupos funcionales de una cadena lateral de aminoácido, tal como un amino libre, hidroxilo, grupo tiol, y combinaciones de los mismos.

[0187] Según una realización, la hélice alfa del péptido de glucagón se estabiliza mediante la incorporación de aminoácidos hidrófobos en las posiciones i e $i + 4$. Por ejemplo, i puede ser Tyr e $i + 4$ puede ser Val o Leu; i puede ser Phe e $i + 4$ puede ser Cys o Met; i puede ser Cys e $i + 4$ puede ser Met; o i puede ser Phe e $i + 4$ pueden ser Ile. Debe entenderse que, para los propósitos del presente documento, los emparejamientos de los aminoácidos anteriores se pueden invertir, de manera que el aminoácido indicado en la posición i , alternativamente, podría estar situado en $i + 4$, mientras que el aminoácido $i + 4$ puede estar situado en la posición i .

[0188] Según otras realizaciones descritas en el presente documento, la hélice alfa se estabiliza mediante la incorporación (ya sea por sustitución o inserción de aminoácidos) de uno o más aminoácidos que estabilizan la hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29 de acuerdo con la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural). En una realización específica, el aminoácido estabilizador de la hélice alfa es un aminoácido α , α -disustituido, que incluye, pero sin limitación, cualquiera entre ácido aminoisobutírico (AIB), un aminoácido disustituido con el mismo grupo o 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, uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) está sustituido con 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 de glucagón de tipo natural) están sustituidos con AIB.

Unión de grupos hidrófilos

[0189] En otra realización, la solubilidad de los péptidos 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 péptidos 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, azidirina, oxirano y 5-piridilo. Si se une al péptido 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).

[0190] Los grupos hidrófilos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioles polioxietilados (por ejemplo, POG), sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), polioxialquilenos, propionaldehído con polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliactetales, 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.

[0191] 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.

[0192] 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.

[0193] 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.

[0194] 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 natural), 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

[0195] La presente descripción también abarca otros conjugados en los que los péptidos de glucagón descritos en el presente documento 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.

[0196] El péptido puede estar unido a grupos de conjugación a través de unión covalente directa mediante la reacción de los residuos de aminoácidos diana del péptido 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 péptido 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 péptido 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.

[0197] 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-imidozol)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, 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.

[0198] 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.

[0199] 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 trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

[0200] 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.

[0201] 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.

[0202] 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.

[0203] 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.

[0204] 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. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

[0205] Los grupos conjugados de ejemplo que se pueden unir a cualquiera de los péptidos 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 péptido de glucagón descrito en el presente documento y una proteína plasmática, en el que la proteína plasmática se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas.

[0206] 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.

5 **[0207]** Tal como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, los péptidos 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).

15 **[0208]** 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 aminoácidos 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.

25 **[0209]** 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.

35 **[0210]** 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).

45 **[0211]** 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.

60 **[0212]** 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, KRNRNIA o KRNR unidas al aminoácido 29 del antagonista de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). 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

65

extensiones C-terminales 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.

5 [0213] En algunas realizaciones, por ejemplo, en péptidos de glucagón que comprenden la extensión C-terminal, la treonina en la posición 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) se sustituye por una glicina. Por ejemplo, un péptido 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. Por ejemplo, la sustitución T29G se puede combinar con las sustituciones de aminoácidos S16E y N20K (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), opcionalmente con un puente de lactama entre los aminoácidos 16 y 20, y opcionalmente con la adición de una cadena de PEG tal como se describe aquí.

[0214] 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.

20 [0215] La presente descripción también abarca multímeros de los péptidos 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 reticulación estándar conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, pueden formarse dímeros entre dos péptidos de glucagón modificados mediante el uso de agentes de reticulación bifuncionales tiol y agentes de reticulación de amina bi-funcionales, en particular para los péptidos de glucagón que han sido sustituidos con residuos de cisteína, lisina, ornitina, homocisteína o acetilfenil alanina.

Acilación y alquilación

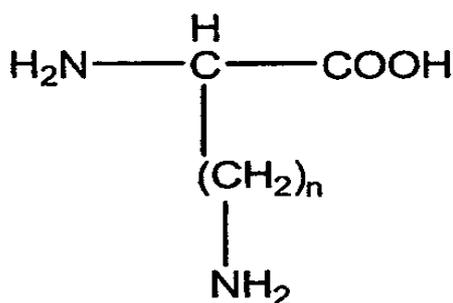
30 [0216] Según algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento se modifican para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo. La acilación o alquilación pueden aumentar la vida media de los péptidos de glucagón en circulación. La acilación o alquilación pueden retrasar ventajosamente 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 péptidos de glucagón acilados es comparable a las versiones no aciladas de los antagonistas de glucagón. Los péptidos de glucagón se 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.

35 [0217] En algunas realizaciones, la presente descripción proporciona un péptido de glucagón modificado para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo unido covalentemente al aminoácido en la posición 10 del péptido de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). El péptido de glucagón puede comprender además un espaciador entre el aminoácido en la posición 10 del péptido 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 péptidos de glucagón acilados o alquilados también pueden comprender además un grupo hidrófilo, opcionalmente un polietilenglicol. Cualquiera de los péptidos de glucagón anteriores puede comprender dos grupos acilo o dos grupos alquilo, o una combinación de los mismos.

40 [0218] La acilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del péptido de 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 natural). El grupo acilo puede unirse covalentemente directamente a un aminoácido del péptido de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del péptido de glucagón a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido del péptido de glucagón y el grupo acilo. Los péptidos 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 natural) y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del péptido de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

[0219] En un aspecto específico, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante acilación directa de una amina, hidroxilo, o tior de una cadena lateral de un aminoácido del péptido de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón se acila directamente a través de la amina, hidroxilo o tior 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 natural). En este sentido, el péptido 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 natural) modificado a cualquier aminoácido que comprenda una amina, hidroxilo, o tior en la cadena lateral. En algunas realizaciones específicas aquí descritas, la acilación directa del péptido de glucagón se produce a través de la amina, hidroxilo, o tior en la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural).

[0220] En algunas realizaciones, el aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral es un aminoácido de fórmula I:

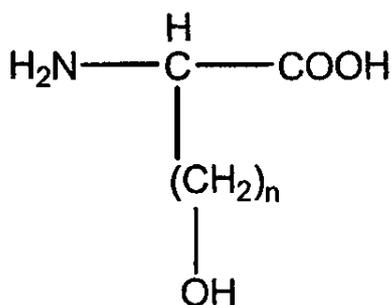


en la que $n = 1$ a 4

[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).

[0221] En otras realizaciones, el aminoácido que comprende un grupo hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II:

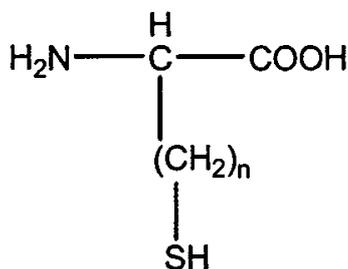


en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula II]

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

[0222] En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tior 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).

[0223] En una realización de aquí descrita, el péptido de glucagón acilado comprende un espaciador entre el péptido y el grupo acilo. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón está unido covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo acilo. En algunas realizaciones de ejemplo, el péptido 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 natural), o en el aminoácido C-terminal del péptido 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 , $-\text{OH}$, o $-\text{COOH}$ en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En este sentido, el péptido 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 natural) modificado a cualquier aminoácido que comprenda amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral.

[0224] 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.

[0225] 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.

[0226] 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.

[0227] 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.

[0228] En una realización, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli (alquiloxi) 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).

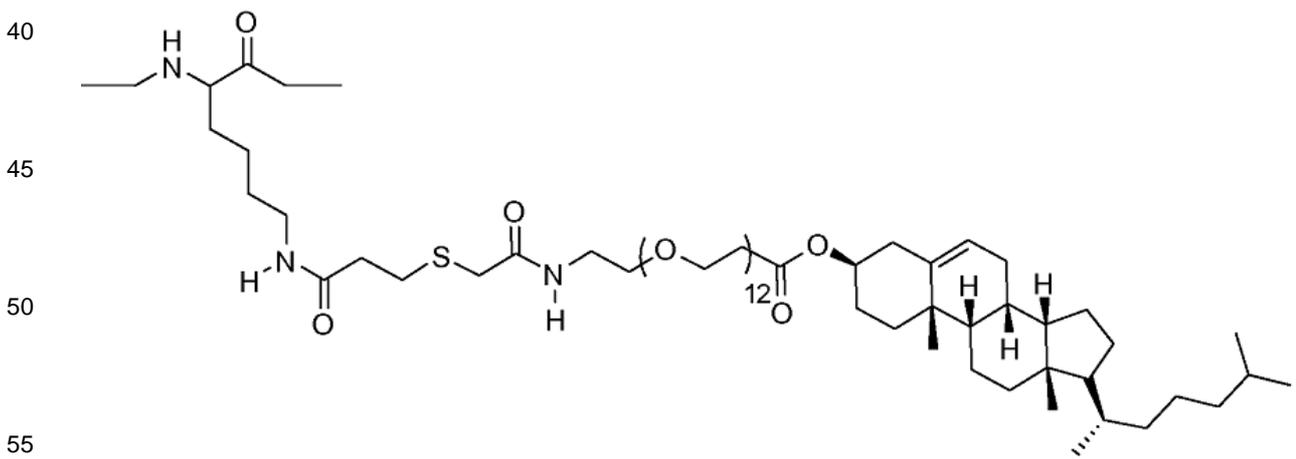
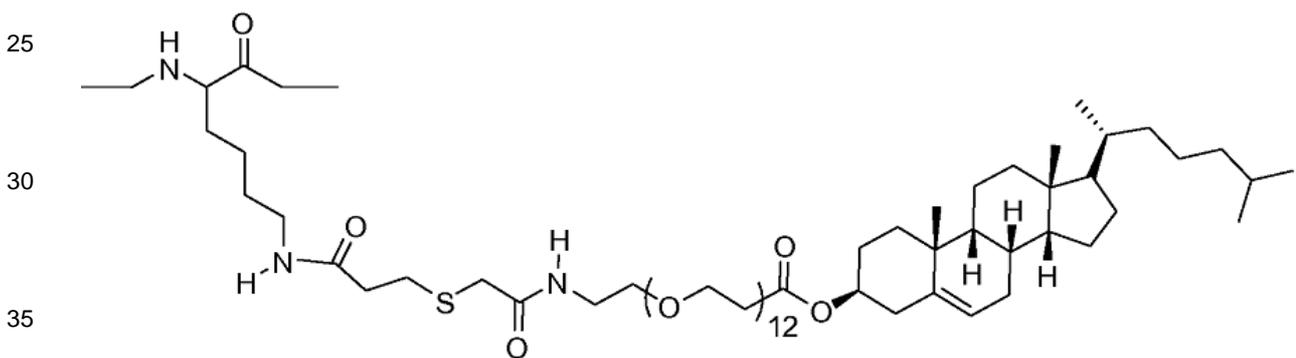
[0229] Los métodos adecuados de acilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos y tioles son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19 (para los métodos de acilación a través de una amina), Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382 (1996); Shimohigashi y Stammer, *Int J 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 Silviu, *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).

5 **[0230]** El grupo acilo del péptido 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 aquí descritas, 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.

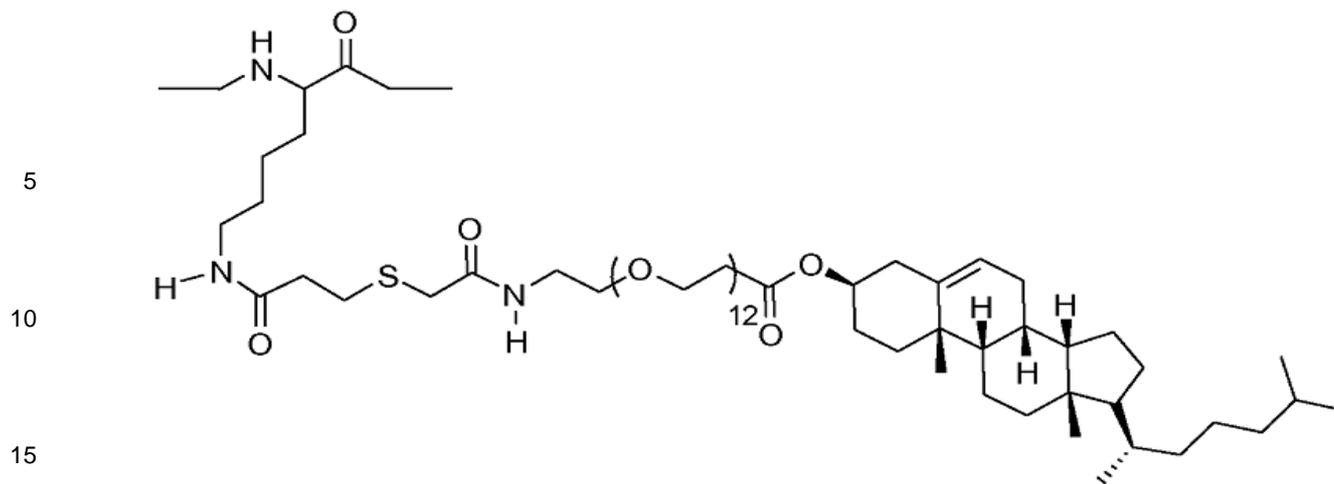
15 **[0231]** En una realización alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo, pero sin limitación, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico, y ácido colesterol.

20 **[0232]** En una realización específica, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende un ácido colesterol, que está unido a un residuo de Lys del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 a través de un espaciador Cys des-amino alquilado, es decir, un espaciador de ácido 3-mercaptopropiónico alquilado. El espaciador de Cys des-amino alquilado puede ser, por ejemplo, un espaciador de Cys des-amino que comprende un resto de dodecaetilenglicol. En una realización, el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la estructura:



60

65



[0233] Los péptidos 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 péptido de glucagón acilado puede comprender la SEQ ID NO: 2, 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 natural) 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 natural), 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 natural), 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 natural).

[0234] Alternativamente, el péptido 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.

[0235] Según una realización, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo que está unido al péptido 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.

[0236] La alquilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del péptido 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 natural). El grupo alquilo puede unirse covalentemente directamente a un aminoácido del péptido de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del péptido de glucagón a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido del péptido de glucagón y el grupo alquilo. Los péptidos 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 natural) y la pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del péptido de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

[0237] En un aspecto específico, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación directa de una amina, hidroxilo, o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del péptido de glucagón. En algunas realizaciones, el antagonista del glucagón se alquila directamente a través de la amina, hidroxilo o tiol 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 natural). En este sentido, el péptido 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 natural) modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol en la cadena lateral. En algunas realizaciones específicas aquí descritas, la alquilación directa del péptido de glucagón se produce

a través de la amina, hidroxilo, o tiol de la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural).

5 **[0238]** 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).

10 **[0239]** 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).

15 **[0240]** En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tiol 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).

20 **[0241]** En una realización aquí descrita, el péptido de glucagón alquilado comprende un espaciador entre el antagonista y el grupo alquilo. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón se une covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo alquilo. En algunas realizaciones de ejemplo, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación 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 del péptido de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). 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 péptido 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 natural) modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato en la cadena lateral.

30 **[0242]** 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.

35 **[0243]** 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.

45 **[0244]** 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.

50 **[0245]** 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.

55 **[0246]** En una realización, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli(alquiloxi)carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, NH₂(CH₂CH₂O)_n(CH₂)_mCOOH, 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).

60 **[0247]** 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.

65 **[0248]** El grupo alquilo del péptido 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.

5 **[0249]** 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.

10 **[0250]** Los péptidos 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
 15 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: 2, 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 natural) 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 natural), 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 natural),
 20 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 natural).

25 **[0251]** Alternativamente, el péptido 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.

30 EJEMPLOS

[0252] Los compuestos aquí descritos 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 aquí descritos 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:

40 **[0253]** 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.

50 **[0254]** 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].

55 **[0255]** 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.

60 Protocolo general de pegilación: (Cys-maleimido)

[0256] 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 a 0,1%/acetonitrilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para producir los derivados pegilados deseados.

EJEMPLO 1

5

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

[0257] 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 acoplamiento individual de Fast Boc activado por HBTU

10

HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 40)

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] 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.

15

20

25

30

[0258] 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

35

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

[0259] 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 acoplamiento individual de Fast Boc activado por HBTU.

40

HSQGTFTSD YSKYLDARRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 41)

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.

45

50

55

60

[0260] 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

65

Glucagón Cys¹⁷ Mal-PEG-5K

5 [0261] 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.

15 [0262] 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 (desercción/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.

20 EJEMPLO 4

Glucagón Cys²¹ Mal-PEG-5K

25 [0263] 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.

35 [0264] 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 (desercción/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.

40 EJEMPLO 5

Glucagón Cys²⁴ Mal-PEG-5K

45 [0265] Se disolvieron 20,1 mg 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).

55 EJEMPLO 6

Glucagón Cys²⁴ Mal-PEG-20K

60 [0266] 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 25,1 mg 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

5

Glucagón Cys <²⁹> Mal-PEG-5K

[0267] 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).

20

EJEMPLO 8

Glucagón Cys²⁴ (2-butirolactona)

[0268] 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.

35

EJEMPLO 9

Glucagón Cys²⁴ (S-carboximetilo)

[0269] 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.

50



55

Peso molecular = 3515.87

SEQ ID NO: 43

Masa exacta = 3512

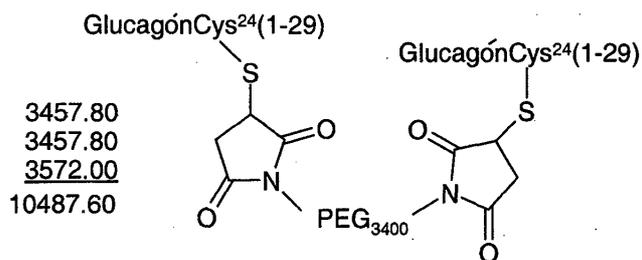
Fórmula molecular = C153H224N42O50S2

60

EJEMPLO 10

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

[0270] 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 A). 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:

[0271] 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).

[0272] 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 natural (SEQ ID NO: 1) más la adición de un carboxi terminal de SEQ ID NO: 21 y Glucagón-Cex R¹² representa la SEQ ID NO: 44.

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

[0273] 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 AMPc

[0274] La capacidad de los análogos de glucagón para inducir AMPc 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 AMPc 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 oscuridad 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 AMPc por análogos de glucagón con extensión C-terminal

Péptido	Inducción de AMPc			
	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
Glucagon Cex	0,25 ± 0,15	6	2,75 ± 2,03	7
Oxintomodulina	3,25 ± 1,65	5	2,53 ± 1,74	5
Oxintomodulina KRNR	2,77 ± 1,74	4	3,21 ± 0,49	2
Glucagón R12	0,41 ± 0,17	6	0,48 ± 0,11	5
Glucagón R12 Cex	0,35 ± 0,23	10	1,25 ± 0,63	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 AMPc mediante análogos de glucagón pegilado

Péptido	Inducción de AMPc			
	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 Dimer	0,10 ± 0,05	3	No determinada	
GLP-1	>1000		0,05 ± 0,02	4

* - número de experimentos

EJEMPLO 14

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

5 **[0275]** 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 restante en relación con el análisis inicial. Los resultados para glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} se muestran en las figuras 1 y 2.

10

EJEMPLO 15

Antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1

15 **[0276]** Los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 se sintetizaron utilizando las siguientes estrategias generales:

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

20 **[0277]** 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 generales 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). Boc-Glu(O_Fm)-OH y Boc-Lys (Fmoc)-OH (Dale Chem-Impex, Wood, IL) se utilizaron en los sitios de formación de puentes lactama. El ácido 3-fenil láctico (PLA) N-terminal (Aldrich, Milwaukee, WI) se acopló manualmente mediante BEPBT (3-(dietoxi-fosforiloxi)-3H-benzo[d][1,2,3]triazin-4-ona, Synchem Inc., Aurora, OH) después de la síntesis en fase sólida automatizada.

25

30 **[0278]** Después de la síntesis en fase sólida de péptidos, cada resina de peptidilo completada se trató con piperidina al 20%/DMF para eliminar los grupos Fmoc. Para la formación del puente de lactama, por lo general se añadieron 299 mg (1 mmol, 5 veces) de BEPBT en DIEA/DMF al 10% y se hicieron reaccionar durante 2-4h hasta que la prueba de la ninhidrina fue negativa.

35

40 **[0279]** Los péptidos fueron escindidos mediante escisión con fluoruro de hidrógeno líquido realizada 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 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 a continuación mediante el procedimiento general de purificación de HPLC.

45

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

50 **[0280]** 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) metoxicarbonilo] 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). Fmoc-Glu (O-2-PhiPr)-OH y Fmoc-Lys (Mmt)-OH (Novabiochem, San Diego, CA) fueron incorporados en los sitios de formación de puentes de lactama.

55

60 **[0281]** Después de la síntesis en fase sólida, se eliminaron el grupo 2-fenilisopropilo (2-PhiPr) en Glu y el grupo 4-metoxitritilo (Mmt) en Lys mediante cromatografía "flash" de TFA al 1%/DCM a través de la resina de peptidilo. Para la formación del puente de lactama, se añadieron habitualmente 150 mg (0,5 mmol, 5 veces) de BEPBT en DIEA al 10%/DMF y se hizo reaccionar durante 2-4h hasta que prueba de ninhidrina dio negativo.

65

[0282] 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.

70

Procedimiento general de HPLC analítica:

75

[0283] 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%.

5

Procedimiento de purificación general de HPLC preparativa:

[0284] Si no se indica específicamente, 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.

10

15

Protocolo general de pegilación: (Cys-maleimido)

[0285] Habitualmente, el análogo Cys de glucagón se disuelve en solución salina tamponada de fosfato (5-10 mg/ml) y se añade ácido etilendiaminetetraacético 0,01 M (10-15% del volumen total). Se añade el reactivo en exceso (1,2-2 veces) maleimido metoxi-polietilenglicol (MAL-m-dPEG) y la reacción se agita a temperatura ambiente durante el seguimiento del progreso de la reacción por HPLC. Después de 2-12h, 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 dar los derivados pegilados deseados.

20

25

[0286] 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 50-100 mM (ajuste del pH 8,0-8,5) y se hacen reaccionar con reactivos de PEG.

30

[0287] Los ejemplos específicos de compuestos sintetizados por los procedimientos descritos anteriormente se proporcionan a continuación:

Síntesis de [PLA6, D9, E16K20 (lactama), D28] glucagón (6-29) amida

[0288] Se sintetizó en primer lugar en fase sólida una secuencia de péptido TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT (SEQ ID NO: 49) 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(O-2-PhiPr), Gln(Trt), Leu, Lys(Boc), Lys(Mmt), 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-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-NH₂ (SEQ ID NO: 6).

35

40

[0289] La resina de peptidilo se sometió a cromatografía "flash" con 50 ml TFA al 1%/DCM en 5-10 minutos y se lavó con DCM, DIEA al 5%/DMF y DMF. Después, la resina de peptidilo se trató con 150 mg (0,5 mmol, 5 veces) de DEPBT en DIEA al 10%/DMF durante 2-4h hasta prueba de la ninhidrina dio negativa.

45

[0290] 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 para obtener 150-250 mg de péptido en bruto. Después de la purificación, se obtuvieron 25 ~ 30 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 7,63 min y el análisis ESI-MS mostró la masa deseada de 2997,0 que se corresponde con el peso molecular de péptido 2997,3.

50

55

[0291] Se utilizaron procedimientos similares para sintetizar los siguientes péptidos: [PLA6, E9, E16K20 (lactama)] glucagón (6-29) amida con 7,17 min por HPLC analítica y 3444,5 por ESI-MS correspondiente al PM calculado 3845,2; [PLA6, D9, K12E16 (lactama), D28] glucagón (6-29) amida con 7,71 min por HPLC analítica y 2997,0 por ESI-MS correspondiente al PM calculado 2997,3; [PLA6, E9, K12E16 (lactama)] glucagón (6-39) amida con 7,27 min por HPLC analítica y 3845,5 por ESI-MS correspondiente al PM calculado 3845,2; [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24, D28] glucagón (6-29) amida con 7,85 min por HPLC analítica y 2972,0 por ESI-MS correspondiente al PM calculado 2972,3; [PLA6, D9, K12E16 (lactama), C24, D28] glucagón (6-29) amida con 7,83 min por HPLC analítica y 2971,5 por ESI-MS correspondiente al PM calculado 2972,3; [PLA6, D9, E16K20 (lactama), D28, C40] glucagón (6-40) amida con 7,13 min por HPLC analítica y 3935,5 por MALDI-MS correspondiente al PM calculado 3935,3.

60

65

Síntesis de [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24 (20K), D28] glucagón (6-29) amida

[0292] Se disolvieron 15mg (0,005 mmol) de [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24, D28] glucagón (6-29) amida y 120 mg (0,006 mmol) de 20K mPEG-MAL (PM ~20K, Chirotech Technology Ltd., Cambs CB4 OWG, German) en 9 ml de acetonitrilo al 25% en agua y aproximadamente 0,5-1 ml de tampón de base Tris 1M (ajuste de 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 en HPLC (2- 6h), la mezcla de reacción se purificó directamente por HPLC preparativa. Las fracciones se comprobaron mediante HPLC analítica a 214 nm y también se midieron por 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 UV se combinaron y liofilizaron. Se pueden obtener aproximadamente 60-80 mg de [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24 (20K), D28] glucagón (6-29) amida cuyo análisis por HPLC analítica mostró un tiempo de retención de 8,5-8,6 min y MALDI-MS mostró una espectrometría de masas amplia a 22K-24K.

[0293] Se utilizaron procedimientos similares para sintetizar [PLA6, D9, K12E16 (lactama), C24 (20K), D28] glucagón (6-29) amida y [PLA6, D9, E16K20 (lactama), D28, C40 (20K)] glucagón (6-40) amida.

Síntesis de dímero [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24, D28] glucagón (6-29) amida

[0294] Se disolvieron 20 mg (0,00673 mmol) [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24, D28] glucagón (6-29) en 6 ml de tampón PBS, 0,5-1 ml de base Tris 1M (ajuste de pH 8,0-8,5) y 3 ml de DMSO. La mezcla de reacción se agitó en un recipiente al aire libre y se controló por HPLC analítica cada 2 h. Después de que el producto inicial (HPLC RT 7,85 min) había desaparecido y el producto dímero (HPLC RT 7,96 min) era el producto dominante (~24h), la mezcla se diluyó con TFA al 0,1%, acetonitrilo al 10% en agua y se purificó directamente por HPLC preparativa. Después de liofilizado, se obtuvieron aproximadamente 6-10 mg de [PLA6, D9, E16K20 (lactama), C24, D28] glucagón (6-29) amida con ESI-MS 5942,0 correspondientes al PM calculado 5942,6.

EJEMPLO 16

Actividades antagonistas de los análogos de glucagón

[0295] 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.

[0296] 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 y las figuras 3A y 3B 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

Glu⁹ es ácido glutámico en la posición 9 según la numeración del glucagón nativo

[0297] 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 aumenta la potencia de los antagonistas de glucagón basados en hCys9 (ver tabla 8).

Tabla 5

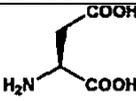
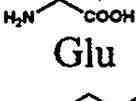
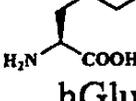
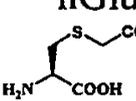
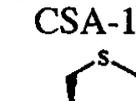
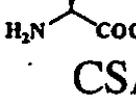
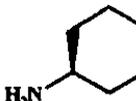
Unión a receptor e inhibición de cAMP por análogos de antagonista				
Compuesto	Péptido	Unión a receptor	Inducción de cAMP	Inhibición de cAMP
		IC ₅₀ (nM)	EC ₅₀ (nM)	IC ₅₀ (nM)
	Glucagón	1,75 ± 0,31	0,21 ± 0,11	N/A
	[desHis ¹ , Glu ⁹]Glucagon-NH ₂	36,90 ± 0,32	65 ± 37	1862 ± 1234
	[desHis ¹ , Glu ⁹ , Phe ²⁵ , Leu ²⁷]	12,59 ± 0,41	81 ± 23	N/A*

	Glucagon-NH ₂			
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

5 [0298] 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	 Asp	14,08 ± 0,34
2	[hGlu ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂	 Glu	8,10 ± 0,40
3	[(CSA-1) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂	 hGlu CSA-1	12,66 ± 0,13
4	[(CSA-2) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂	 CSA-2	13,28 ± 0,78
5	[β-hGlu ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂	 β-hGlu	37,10 ± 0,34
6	[(NSG-1) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂	 NSG-1	983 ± 82
7	[(NSG-2) ⁹]Glucagón (aa2-29)-NH ₂	 NSG-2	2348 ± 382

^aEC₅₀ (nM); posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón natural indicado por números en

superíndice

[0299] 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 [0300] Se analizaron los péptidos de glucagón que comprenden un aminoácido modificado en la posición 9 (según la numeración del glucagón natural) 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

15

[0301] La tabla 8 proporciona la afinidad por el receptor de glucagón y la actividad antagonista para análogos de glucagón adicionales, en los que los análogos comprenden 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.

20

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

Péptido	IC ₅₀ (nM)	AMPc	
		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

5 [0302] También se han desarrollado análogos específicos de glucagón en los que la fenilalanina que aparece normalmente en la posición seis ha sido sustituida 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.

15 **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	IC50 (nM) (unión al receptor)	IC50 (nM) (cAMP, inhibición de glucagón) 0,1 nM o 0,2 nM	Solubilidad (% , pH 6-8)
Glucagón	1,96 ± 0,61	0,09 (EC50)	
[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

20 [0303] 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 demuestran que el análogo PLA6 es un antagonista apreciablemente más potente que los péptidos ligeramente alargados.

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

- 5 **[0304]** 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 pegilan. Sin embargo, esta restauración del agonismo no se observa en los análogos peptídicos PLA6. Se examinaron varios sitios de pegilación específicos, incluyendo las
- 10 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)] > 10000 sin antagonismo
 Glucagón (aa6-29)-NH₂

Las posiciones de aminoácidos según la numeración de glucagón nativo indicado por superíndices

EJEMPLO 17

5 [0305] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

Actividades del antagonista de glucagó/agonistas de GLP-1

10 [0306] Se compararon la unión a receptor, inducción de AMPc e inhibición por AMPc de glucagón y diversos inhibidores derivados de glucagón. Los ensayos para medir la unión al receptor y la inducción de AMPc y la inhibición dpor AMPc se realizaron utilizando el sistema de ensayo esencialmente como se describe en los Ejemplos 12 y 13, respectivamente.

15 [0307] Se han preparado análogos de glucagón específicos que presentan tanto antagonismo de glucagón como agonismo de GLP-1. Más en particular, se han preparado compuestos específicos en los que los primeros cinco aminoácidos del glucagón natural se han eliminado y el residuo de ácido aspártico en la posición 9 con respecto al glucagón natural ha sido sustituido por ácido glutámico. Estos compuestos muestran que la actividad del receptor de GLP-1 se puede mejorar mediante la modificación adicional del péptido para incluir una sustitución de ácido glutámico en la posición 16, con respecto al glucagón natural (ver Figura 5). Además, tal como se indica en los datos presentados en la Tabla 13 y en las Figuras 6-8, un análogo de glucagón que tiene los primeros cinco aminoácidos suprimidos con respecto al glucagón natural y la formación de anillos de lactama entre las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 7 y 11 o 11 y 15 muestra actividad antagonista de glucagón y de GLP-1.

25 **Tabla 13: Péptidos de glucagón lactama (6-39) y actividad antagonista de glucagón y agonista de GLP-1**

			GLP-1 EC ₅₀ (nM)	Glu IC ₅₀ (nM)
1	E9, K12,E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16 (lactama)	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	63	2008
3	E9, E16K20 (lactama)	FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	36	42
4	D9, K12E16 (Lactama)	FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	118,7	828
5	[PLA6, E9, PLA- K12E16 (lactama)	TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, PLA- E16K20 (lactama)]	TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20

30 **Tabla 14: Péptidos de glucagón lactama (1-29, 2-29, 4-29 y 6-29) y su actividad antagonista de glucagón y agonista de GLP-1 (PA = antagonista parcial)**

		GLP-1 EC ₅₀ (nM)	Glucagón IC ₅₀ (nM)
	Glucagón HSQGTFTSDYSDKYIDSRRAQDFVQWLMNT		0,2~1,0*
	GLP-1(aa1-30) HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIWVWVGR	0,02-0,1	
1	[PLA6, D9, E16K20(lactama), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYIDERRAKDFVQWLMNT	5-25	10-30
2	[PLA6, D9, K12E16 (Lactama), D28]G(6-29) PLA TSDYSKY1DEERAQDFVQWLMNT	177	63
3	[PLA6, D9, E16, K20E24(Lactama), D28]G(6-29) PLA TSDYSKYLDERRAEDFVKWLMNT	239	74
4	[PLA6, D9, E16, E24K28(lactam), D28]G(6~29) PLA TSDYSKYLDERRAQDFVEWIMKT	289	22
5	[E9, E16K20(lactama), D28]G(4~29) GTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNT	151	10-30

6	[E9,E16K20(lactama), D28]G(2-29) SQGTFTSEYSKYIDERRAKDFVQWLMDT	203	49 (PA)
7	[A2E3, E16K20(Lactama),D28]G(2~29) AEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	175	63
8	[A2E3, E16K20(Lactam), D28]G(1~29) HAEGTFTSEYSKYIDERRAKDFVQWLMDT	0,2	130 (PA)
9	YANK2 (péptido Bayer) HSQGTFTSDY ARYLDARRAREFIKWL VRGRG	0,28	Agonista
*EC50 en el receptor de glucagón			

Como se ha demostrado por los datos presentados en la Tabla 14 y las figuras 6-8, se han desarrollado análogos específicos de glucagón que muestran antagonismo del glucagón/agonismo de GLP-1, donde la fenilalanina normalmente en la posición seis ha sido sustituida por ácido fenil-láctico (Pla), en un esqueleto de amida de glucagón acortado 6-29 (los "análogos PLA6") y se forma un puente de lactama entre las cadenas laterales del análogo de glucagón. Como se demuestra por las Figuras 6A y 6B, la introducción de lactama en un esqueleto de otro modo antagonista de glucagón mantiene un antagonismo potente sin agonismo residual. Las figuras 7A, 7B, 8A y 8B presentan datos que muestran que la introducción de una lactama en el esqueleto de otro modo antagonista de glucagón introduce un agonismo de GLP-1 completo de potencia variable, dependiente de la secuencia específica del péptido y la ubicación de la lactama.

[0308] La tabla 15 enumera una serie de diferentes péptidos que demuestran un agonismo completo de GLP-1 y un antagonismo completo de glucagón. Se han desarrollado dos andamiajes de esqueletos de diferentes péptidos donde la principal diferencia es la extensión C-terminal del glucagón 6-29 con un nonapéptido CEX (SEQ ID NO: 21).

Tabla 15: Perfil de agonista/antagonista mixto

Análogos de glucagón (6-CEX)				
1	E9, K12, E16	FTSEYSKYIDERRAQDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16 (lactama)	FTSEYSKYIDERRAQDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	63	2008
3	E9, E16K20 (lactama)	FTSEYSKYIDERRAKDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	36	42
4	D9, K12E20 (lactama)	FTSDYSKYIDERRAQDFVQWIMNTGPSSGAPPPS	18	828
5	[PLA6, E9, K12E20 (lactama)]	PLA-TSEYSKYIDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, E16K20 (lactama)]	PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20
Análogos de glucagón D ⁹ (6-29)				
			GLP-1 EC50 (nM)	Glucagón IC50 (nM)
7	PLA 6, D9, D28	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	700	Tbd
8	PLA6, D9, K12E20 (lactama)	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	21	13
9	PLA6, D9, E16K20 (lactama)	PLA-TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	4	8

[0309] La introducción sistemática de agonismo a un péptido que mantiene el antagonismo en un receptor altamente homólogo no tiene precedentes en la química de péptidos. Hay un informe de dicho antagonista del glucagón/agonista de GLP-1 mixto en la literatura aportados por Bayer Research Labs [Journal of Endocrinology (2007) 192: 371-80 y Journal of Biological Chemistry (2006) 282: 12506-15]. Sin embargo, el análisis del péptido descrito previamente (ANK2; SEQ ID NO: 37) reveló que el péptido no posee un antagonismo de glucagón significativo. Más particularmente, las Figuras 9A-9C presentan datos que muestran que el péptido de Bayer (ANK2; SEQ ID NO: 37), en comparación con el nuevo antagonista de glucagón/agonistas de GLP-1 descritos en este documento, no es un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 mixto. El péptido ANK2 tiene un agonismo de GLP-1 muy potente, pero demuestra un agonismo de glucagón débil, pero completo. Los péptidos descritos en este documento son químicamente diferentes, ya que no poseen los residuos N-terminales nativos, tienen un amino no natural en el extremo N-terminal acortado, y poseen un enlace interno entre las cadenas laterales del análogo (por ejemplo, en forma de un puente salino o una lactama en el esqueleto). Los péptidos se pueden pegar selectivamente para extender la duración de la acción sin cambiar las propiedades mixtas agonistas/antagonistas.

EJEMPLO 18

[0310] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

[0311] 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.

[0312] Para la pegilación de péptidos, se hace reaccionar metoxi poli(etilenglicol) maleimido propionamida de 40 kDa (Chirotech 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 19

[0313] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

[0314] El depsipéptido se ensambló usando la síntesis de péptidos en fase sólida convencional (SPPS). La cadena de péptido derivado con PLA se cicló a través de un puente de lactama primero y a continuación se esterificó por aminoácido usando anhídrido simétrico preactivado manualmente. La SPPS clásica se continuó hasta completar toda la secuencia. El procedimiento de escisión y purificación estándar se aplicaron para obtener el depsipéptido deseado.

Ejemplo

Síntesis de depsipéptido con puente de lactama [Aib2, E3, Thr5-O-PLA6, E16K20 (lactama), D28] G (2-29) amida

[0315] Se sintetizó una resina de peptidilo HO-PLA-TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT [PLA6, E16, K20, D28] glucagón (6-29) 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, excepto el ácido glutámico en la posición 16 fue incorporado con Boc-Glu(OH)-OH y la lisina en la posición 20 se incorporó con Boc-Lys(Fmoc)-OH. Después de la eliminación de los grupos protectores Fmoc y Fm en la posición 16 y 20 con 20% de piperidina en DMF, la resina de peptidilo se trató con 300 mg (1 mmol) de DEPBT en DIEA al 10%/ DMF durante aproximadamente 4 h para formar el puente de lactama. A esta resina de peptidil con puente de lactama se añadió una solución de anhídrido simétrico preactivado compuesto de Boc-Thr(OBzl)-OH (2 mmol)/DIC (1 mmol)/DMAP (0,2 mmol) en DCM y la reacción se dejó proceder durante 16 h. Los restantes aminoácidos Boc-Gly-OH, Boc-Glu(OcHx)-OH y Boc-AIB-OH se acoplaron por química estándar Boc de nuevo para obtener la resina depsipeptidilo de la siguiente secuencia: Aib-Glu-Gly-Thr-O-PLA-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu*-Arg-Arg-Ala-Lys*-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-NH₂. (*están con puentes lactama)

[0316] 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 RP-HPLC analítica y el análisis ESI-MS produjo la masa deseada de 3368,5 que se corresponde con el peso molecular calculado de 3369,0 daltons.

[0317] Se utilizó un procedimiento similar para sintetizar los otros depsipéptidos con puente de lactama descritos en esta patente.

EJEMPLO 20

[0318] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

[0319] 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 por la capacidad de estimular el receptor de glucagón mediante el ensayo de liberación de AMPc de las células que expresan el receptor de glucagón humano y se estimularon con glucagón 0,2-0,8 nM, tal como se describe en general en el Ejemplo 13.

[0320] El efecto de lactamización y extensión C-terminal en péptidos antagonistas de glucagón/GLP-1 se exploró mediante la producción y el ensayo de péptidos antagonistas de glucagón/GLP-1 extendidos en C-terminal con y sin lactamas que puentean las cadenas laterales de Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 (según la numeración de glucagón natural). Los resultados combinados de tres ensayos separados se muestran en la Tabla 16.

TABLA 16

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,2-0,8 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,12 ± 0,02 (EC50)	
GLP-1			0,038 ± 0,002
[E9, E16] G (6-39)	71	762 ± 127	1451 ± 118
[E9, E16, K20] G (6-39)	105	Agonista débil	1042,3 ± 11,9
[PLA6, E9, E16] G (6-39)	72	58,08	1756,5
[E9, E16K20 (lactama)] G (6-39)	73	42 ± 3,6	36,4 ± 3,5
[PLA6, E9, E16K20 (lactama)] G (6-39)	74	20,5 ± 2,5	20,0 ± 5,5

[0321] Tal como se muestra en la Tabla 16, los péptidos extendidos en C-terminal que comprenden un puente de lactama exhibieron un aumento de la actividad de GLP-1 en comparación con los péptidos correspondientes que carecen de un puente de lactama.

[0322] El efecto de la posición del puente de lactama en la secuencia peptídica del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 se ensayó mediante la producción y la prueba de péptidos con una lactama que une las cadenas laterales de los aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, o 24 y 28 (según la numeración de aminoácidos de glucagón natural). Los resultados combinados de tres ensayos separados se muestran en la Tabla 17

TABLA 17

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,2-0,8 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,19 ± 0,015 (EC50)a	
GLP-1			0,014 ± 0,003
[PLA6, K12E16 (lactama), D28] G (6-29)	75	58,3 ± 3,3	38,5 ± 7,6
[PLA6, E16K20 (lactama), D28] G (6-29)	76	11,7 ± 2,8 (ensayo 1), 5,5 ± 0,2 (ensayo 2)	6,9 ± 4,6 (ensayo 1), 4,2 ± 1,6 (ensayo 2)
[PLA6, E16, K20E24 (lactama), D28] G (6-29)	77	74,4 ± 8,4	239,6 ± 102,2
[PLA6, E16K20 (lactama), E21, D28] G (6-29)	103	8,6 ± 0,1	11,1 ± 2,6
[PLA6, E16, E24K28 (lactama)] G (6-29)	78	22,4 ± 1,7	289,2 ± 148,8
[PLA6, E9,	74	20,5 ± 2,5	20,0 ± 5,5

E16K20(lactama), D28] G (6-39)			
--------------------------------	--	--	--

5 **[0323]** Tal como se muestra en la Tabla 17, los péptidos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 que comprenden un puente de lactama entre los aminoácidos 16 y 20 (según la numeración de glucagón natural) exhibió la mayor actividad de GLP-1. Un puente de lactama entre los residuos 12 y 16 también permitió que el péptido mostrara una potente actividad de GLP-1.

10 **[0324]** Los péptidos antagonistas de glucagón/GLP-1 modificados para reemplazar la secuencia de aminoácidos de glucagón natural por la secuencia nativa de GLP-1 fueron sintetizados y comparados con los correspondientes péptidos que carecen de la sustitución de la secuencia de GLP-1. Los resultados combinados de tres ensayos separados se muestran en la Tabla 18.

TABLA 18

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,2-0,8 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,19 ± 0,015 (EC50) ^a	
GLP-1			0,014 ± 0,003
[PLA6, K12E16 (lactama), D28] G (6-29)	75	58,3 ± 3,3	38,5 ± 7,6
[PLA6, K12E16 (lactama), GLP(23-32)] G (6-29)	79		Sin agonismo
[PLA6, E16K20 (lactama), D28] G (6-29)	76	11,7 ± 2,8 a 5,5 ± 0,2	6,9 ± 4,6 (ensayo 1), 4,2 ± 1,6 (ensayo 2)
[PLA6, E16K20 (lactama), GLP(23-32)] G (6-29)	80	11,7 ± 0,5b, 73,5 ±	51,2 ± 11,2
[PLA6, E16, GLP(23-32)] G (6-29)	104	64,5 ± 11,4 ^b	85,6 ± 12,7 ^b
[A2E3, E9, E16K20(lactama), D28] G (2-29)	81	63,2 ± 2,3	175,2 ± 15,7
[A2E3, E9, E16K20(lactama), GL(23-32)] G (2-29)	82	423±-- antagonista parcial*	9,8 ± 4,2*
[H1A2E3, E9, E16K20(lactama), D28] G (1-29)	83	129 ± 106 antagonista parcial	0,11±--
[H1A2E3, E9, E16K20(lactama), GLP(23-32)] G (1-29)	84	2148± -- antagonista parcial*	0,017±--

15 **[0325]** Tal como se muestra en la Tabla 18, el efecto de sustituir la secuencia de glucagón natural por la secuencia de GLP-1 alrededor de las posiciones 16-25 de (según la secuencia de glucagón natural) aumentó la actividad agonista de GLP-1 en la mayoría de los casos. Sin embargo, para los péptidos que comprenden adicionalmente la secuencia de GLP-1 en las posiciones 2 y 3 (según la secuencia de glucagón natural) y carecen de PLA, la sustitución por la secuencia de GLP-1 alrededor de las posiciones 16-25 disminuyó la actividad antagonista del glucagón.

20

[0326] Se produjeron y analizaron péptidos antagonista de glucagón/GLP-1 que carecen de PLA con diversos truncamientos N-terminales. Algunos de los péptidos también tenían la secuencia N-terminal de GLP-1. Los resultados combinados de dos ensayos separados se muestran en la Tabla 19.

25

TABLA 19

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,8 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,55 (EC50)	
GLP-1			0,021, 0,0086*

[PLA6, E16K20 (lactama), D28] G (6-29)	76	13,7 ± 1,2	10,6 ± 0,97
[G4T5, E9, E16K20 (lactama), D28] G (4-29)	85	12,7 ± 1,1	151,4 ± 8,8
[S2Q3, E9, E16K20 (lactama), D28] G (2-29)	86	48,6 ± 22,3 antagonista parcial	203,2 ± 4,2
[A2E3, E9, E16K20 (lactama), D28] G (2-29)	81	63,2 ± 2,3	175,2 ± 15,7
[H1A2E3, E9, E16K20 (lactama), D28] G (1-29)	83	129 ± 106 antagonista parcial	0,11 ± --
ANK2 (péptido de Bayer)	*	Agonista débil	0,28 ±--
* ANK2 se describe en Pan et al, J Biol Chem 281 (18): 12506-12515 (2006).			

[0327] Tal como se muestra en la Tabla 19, el péptido antagonista de glucagón/GLP-1 que comprende PLA es un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 más potente.

- 5 **[0328]** Se produjeron y analizó la actividad de depsi péptidos de antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 (que comprenden PLA en la posición n (n = 5 o 6) unido a Thr en la posición n-1 a través de un enlace éster). Su potencia como antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 se comparó con un péptido que comprende PLA como el aminoácido N-terminal y los péptidos que carecen de PLA todos juntos. Los resultados combinados de dos ensayos separados se muestran en la Tabla 20.

10

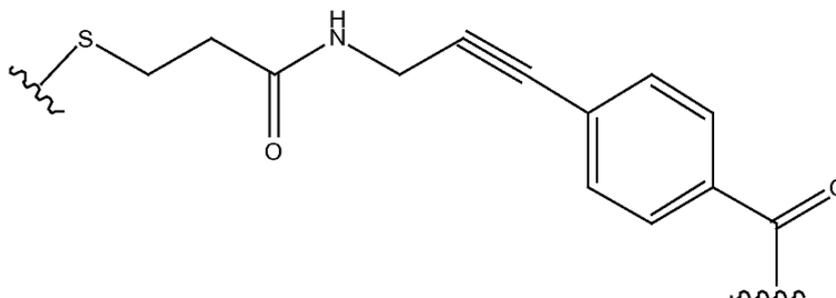
TABLA 20

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,8 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,55 (EC50)	
GLP-1			0,021, 0,0086*
[PLA6, E16K20(lactama), D28] G(6-29)	76	13,7 ± 1,2	10,6 ± 0,97
[S2Q3, E9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	86	48,6 ± 22,3 antagonista parcial	203,2 ± 4,2
[A2E3, E9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	81	63,2 ± 2,3	175,2 ± 15,7
[H1A2E3, E9, E16K20(Lactama), D28] G(1-29)	83	129 ± 106 antagonista parcial	0,11 ± -6
[S2Q3 -O-PLA6, D9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	66	3,14 ± 1,89	45,70 ± 12,34
[A2E3 -O-PLA6, D9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	64	4,68 ± 0,44	13,98 ± 1,02
[H1A2E3 -O-PLA6, D9, E16K20(Lactama), D28] G(1-29)	87	9,65 ± 0,57	6,20 ± 0,91

- 15 **[0329]** Tal como se muestra en la Tabla 20, la modificación de péptidos a depsi péptidos provocó un aumento tanto de la actividad agonista de GLP-1 como la actividad antagonista de glucagón.

- 20 **[0330]** El efecto de PEGilación de péptidos antagonistas de glucagón/agonista de GLP-1 se exploró mediante la síntesis de péptidos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 con grupos PEG de 20.000 Dalton unidos al aminoácido en la posición 24 (según la numeración de glucagón natural) o unidos al residuo C-terminal de péptidos que comprenden una extensión C-terminal. Para el péptido "[PLA6, E16K20 (lactama), K24 (COCH₂CH₂S-20 kDa)] G (6-29)," se acopoló ácido 3-mercaptopropiónico a la amina de cadena lateral de Lys en la posición 24 (según la

numeración de glucagón natural) para la pegilación. Para el péptido "[PLA6, E16K20 (lactama), K24 (rígido-S-20 kDa)] G (6-29)," se acopló primero ácido 3-aminoprop-1-inil-benzoico a la amina de cadena lateral de Lys en la posición 24 y a continuación se acopló ácido 3-mercaptopropiónico a la parte rígida unida para la pegilación. El enlazador resultante tenía la siguiente estructura:



Los péptidos se ensayaron a continuación para la actividad agonista en el receptor de GLP-1 y la actividad antagonista en el receptor de glucagón tal como esencialmente se describe en el presente documento. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

TABLA 21

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,2-0,8 nM) 0,1-0,5 (EC50)	EC50 (nM)
Glucagón	1		
GLP-1			0,01-0,05
[PLA6, K12E16(lactama), D28]G(6-29)	75	58,3 ± 3,3a	38,5 ± 7,6 a
[PLA6, K12E16(lactama), C24(20 kDa), D28]G(6-29)	88	628 ± 120 (n = 1)	550-753 (n = 3)
[PLA6, K12E16(Lactama), D28, CEX- C40(20 kDa)]G(6-40)	89	No antagonista (n = 1)	657 ± 28 (n = 1)
[PLA6, E16K20(lactama), D28]G(6-29)	76	5-27 (n = 10)	5-28 (n = 10)
[PLA6, E16K20(Lactama), C24(20 kDa), D28]G(6-29)	90	374-1462 (n = 3)	450-1842 (n = 4)
[PLA6, E9,E16K20(Lactama), C24(20 kDa)]G(6-29)	114	No detectado	825 (n = 1)
[PLA6, E 16K20(Lactama), D28, CEX- C40(20 kDa)]G(6-40)	91	350-500 (n = 5)	75-100 (n = 5)
[PLA6, E16K20(Lactama), K24(COCH2CH2S-20 kDa)]G(6-29)	115	300-400 (n = 3)	16-20 (n = 2)
[PLA6,E16K20(Lactama), K24(rígido-S-20 kDa)]G(6-29)	116	393-620 (n = 2)	1362-2675 (n = 2)
[PLA6, E16K20(Lactama),D28,GP-C40(20 kDa)]G(6-40)	117	423 ± 133 (n = 1)	43,6 ± 32 (n = 1)
[PLA6, E16K20(Lactama),D28,G29, CEX-C40(20 kDa)]G(6-40)	118	335 ± 86 (n = 1)	180,2 ± 64 (n = 1)

[0331] Tal como se muestra en la Tabla 21, la pegilación generalmente aumentó la IC50 en el receptor de glucagón

y aumentó la EC50 en el receptor de GLP-1.

[0332] El efecto de la acilación de ácidos grasos de péptidos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 se exploró mediante la producción y análisis del péptido antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 [PLA6, E16K20 (lactama), D28] G (6-29) que comprende un ácido graso C16 unido a un residuo de Lys del péptido a través de un espaciador de residuo de ácido glutámico, en el que el residuo de Lys varió en la posición de aminoácido dentro de la secuencia del péptido antagonista de glucagón/agonista de GLP-1. Los resultados se muestran en la Tabla 22.

TABLA 22

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,4 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,14 (EC50)	
GLP-1			0,06
[PLA6, E16K20(lactama),D28]G(6-29)	76	5-7 (n = 10)	20,73 ± --
[C16FA-O-PLA6, E16K20(lactama),D28]G(6-29)	92	337,8 ± 79,7	45,7 ± 13,8
[PLA6, K10(EC16FA), E16K20(lactama),D28]G(6-29)	93	31,1 ± 4,1	128,8 ± 38,7
[PLA6, E16, K20(EC16FA), D28]G(6-29)	94	576,5 ± 20,7	1290 ± 331
[PLA6, E16K20(lactama), K24(EC16FA), D28]G(6-29)	95	371,9 ± 40,0	292,7 ± 40,4
[PLA6, E16K20(lactama), D28, K29(EC16FA)]G(6-29)	96	386,4 ± 26,2	1412 ± 407
[PLA6, K10(EC16FA), E16, K20,D28]G(6-29)	106	221,9 ± 41,7	105,0 ± 30,3

EJEMPLO 21

[0333] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

[0334] Se prepararon péptidos modificados con colesterol mediante la conjugación de péptidos lactamizados con un derivado de colesterol bromoacetilado en solución. Los péptidos se ensamblaron utilizando la síntesis convencional de péptidos en fase sólida (SPPS). La cadena de péptido derivada con PLA se cicló a través de un puente de lactama. El procedimiento de escisión y purificación estándar se aplicaron para obtener el depsipéptido deseado.

Ejemplo

Síntesis de péptido con puente lactama [PLA6, K10 (COCH2CH2S-Chol), E16K20 (lactama), D28] G (6-29) amida conjugado con colesterol

[0335] Se sintetizó una resina de peptidilo con secuencia de HO-PLA-TSDKSKYLDERAKDFVQWLMDT [PLA6, K10, E16, K20, D28] glucagón (6-29) mediante química Boc en fase sólida utilizando un sintetizador de péptidos automático 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 (CHO), Tyr (2,6-di-Cl-Bzl) y Val, excepto que el ácido glutámico en la posición 16 fue incorporado con Boc-Glu(OH) -OH, la lisina en la posición 20 se incorporó con Boc-Lys(Fmoc)-OH y la lisina en la posición 10 se incorporó con Boc-Lys(Alloc)-OH. Después de la eliminación de los grupos protectores Fm y Fmoc en las posiciones 16 y 20 con piperidina al 20% en DMF, la resina de peptidilo se trató con 300 mg (1 mmol) de DEPBT en DIEA al 10%/DMF durante aproximadamente 4 h para formar el puente de lactama. Esta resina de peptidilo con puentes de lactama se trató con una solución compuesta de 100 mg (0,4 equiv.) de Pd (PPh₃)₄, 120 µL de PhSiH₃, 0,25 ml de N-metilmorfolina y 0,5 ml de ácido acético en 10 ml de CHCl₃ en atmósfera de N₂ durante aproximadamente 3 h para eliminar el grupo Alloc. El ácido 3-tritilopropiónico se acopló a continuación mediante DEPBT para obtener la resina de peptidilo con una secuencia de: HO-PLA-Thr-Ser-Asp-Lys(COCH2CH2SH)-Ser-

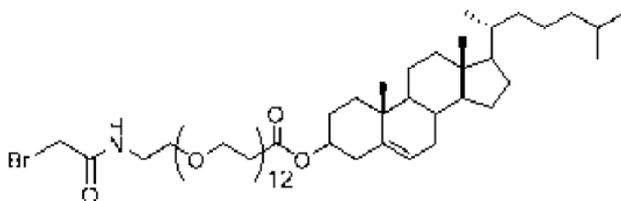
Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu*-Arg-Arg-Ala-Lys*-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-NH₂. (*Están con puentes de lactama).

5 [0336] 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 péptido se purificó por HPLC preparativa, y se analizó por MS y RP-HPLC analítica. El péptido purificado mostró un solo pico en RP-HPLC analítica y el análisis ESI-MS produjo la masa deseada de 3050,7 que se corresponde con el peso molecular calculado de 3051.0 daltons del péptido [PLA6, K10 (CH₂CH₂SH), E16K20 (lactama), D28] G (06/29) amida.

10 [0337] Para sintetizar el péptido [PLA6, K10 (COCH₂CH₂S-Chol), E16K20 (lactama), D28] G (6-29) amida conjugado a colesterol, se disolvieron 10 mg (3,28 μM) de [PLA6, K10 (COCH₂CH₂SH), E16K20 (lactama), D28] G (6-29) amida en 2 ml de tampón de urea 7 M que contiene Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). A esta solución se añadieron 10 mg (9 μM) de reactivo de colesterol Br-Oxa₁₂-Chol (véase la estructura más adelante), a temperatura ambiente. La reacción se controló por HPLC. Después de aproximadamente 4 h, la solución de reacción se purificó directamente por HPLC. El péptido conjugado con colesterol purificado mostró un único pico en la cromatografía analítica y el análisis ESI-MS produjo la masa deseada de 4074,13, que se corresponde con el peso molecular calculado de 4073,0 del péptido con puente lactama conjugado con colesterol [PLA6, K10 (COCH₂CH₂S-Col), E16K20 (lactama), D28] G (6-29) amida.

20

25



30

Br-Oxa₁₂-Col

35 [0338] Se utilizaron procedimientos similares para sintetizar otros péptidos conjugados con colesterol y con puentes lactama, tales como [PLA6, E16K20 (lactama), D28, K30 (COCH₂CH₂S-Col)] G (6-30) amida y [PLA6, E16K20 (lactama), D28, K40 (COCH₂CH₂S-Col)] G (6-40) amida descritos en esta patente.

40 [0339] Se analizaron los péptidos colesterilados para determinar la actividad agonista en el receptor de GLP-1 y la actividad antagonista en el receptor de glucagón tal como esencialmente descrito en el Ejemplo 13. La EC₅₀ de los péptidos en el receptor de GLP-1 y la IC₅₀ del péptido en el receptor de glucagón estimulado con 0,4 nM de glucagón se muestran en la Tabla 23.

TABLA 23

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC ₅₀ (nM, inhibir glucagón 0,4 nM)	EC ₅₀ (nM)
Glucagón	1	0,118 (0,01) (EC ₅₀)	
GLP-1			0,043 (0,003)
PLA6D9(E16K20)D28G(6-29)	60	4,14; 7,99*	47,96 (10,8)
Aib depsi lactama G(2-29)	70	11,82 (1,83)	5,83 (0,9)
K10-chol G(6-29)	67	271,49 (60,07)	35,25 (10,0)
K30-chol G(6-30)	68	575,20 (77,91)	14,38 (2,8)
K40-chol G(6-40)	69	311,55 (102,98)	47,05 (14,6)
Desviación estándar mostrada en ()			
*Resultados de dos ensayos diferentes mostrados			

45 EJEMPLO 22

[0340] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

50 [0341] Se exploró el efecto de estabilización de la hélice alfa mediante la incorporación de un aminoácido alfa,alfa-disustituido en péptidos antagonistas de glucagón/GLP-1. Se produjo un péptido que comprende los aminoácidos 6-

29 de glucagón modificado para comprender PLA en lugar de la Phe en la posición 6 y AIB en la posición 16 (según la numeración de glucagón natural) y que comprende una amida C-terminal (SEQ ID NO: 97) y se analizó la actividad antagonista del glucagón y la actividad agonista de GLP-1. La IC50 en el receptor de glucagón en respuesta a 0,2 nM de glucagón era 7,04 (0,69) en un ensayo y 22,0 (2,84) en otro (SD proporcionado en paréntesis). La EC50 en el receptor de GLP-1 fue 795 (31,2)

EJEMPLO 23

[0342] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

[0343] Se modificaron péptidos antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 a depsipéptidos que contienen PLA y/o para comprender los aminoácidos nativos de GLP-1 en las posiciones 2 y 3 en lugar de los aminoácidos nativos del glucagón en estas posiciones (numeración según GLP-1 y glucagón nativos). Los péptidos se ensayaron a continuación para las actividades de antagonista de glucagón y GLP-1. Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 24.

TABLA 24

Péptido	SEQ ID NO:	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
		IC50 (nM, inhibir glucagón 0,4 nM)	EC50 (nM)
Glucagón	1	0,323 (EC50)	
GLP-1			0,057
[PLA6, E16K20(lactama), D28] G(6-29)	60	20,34 ± 1,8	18,22 ± 0,56
[PLA6, E9] G(6-29)	61	94,65 ± 17,95	900,72 ± 818,56
[PLA6, E9K12(Lactama)] G(6-29)	62	72,47 ± 7,04	143,95 ± 21,62
[A2E3, E9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	63	151,46*	298,56*
[A2E3 -O-PLA6, D9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	64	21,80 ± 6,45	18,01 ± 2,14
[S2Q3, E9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	65	23,37*	283,43*
[S2Q3 -O-PLA6, D9, E16K20(Lactama), D28] G(2-29)	66	20,85 ± 3,09	112,21 ± 11,12

EJEMPLO 24

[0344] Todos los péptidos descritos en el presente documento comprenden una amida C-terminal en lugar del carboxilato C-terminal, a menos que se indique lo contrario. Las posiciones de los aminoácidos designados en el nombre del péptido están en conformidad con la numeración de glucagón natural.

[0345] Los siguientes péptidos fueron sintetizados como se describe en general anteriormente y posteriormente se analizó la capacidad de estimular el receptor de GLP-1 mediante el ensayo de liberación de AMPc de células que expresan el receptor de GLP-1 humano y la capacidad de estimular el receptor de glucagón mediante el ensayo de liberación de AMPc de células que expresan el receptor de glucagón humano y estimuladas con 0,5 nM de glucagón, tal como se describe en general en el Ejemplo 13. Los resultados de los ensayos se muestran en la Tabla 25.

TABLA 25

Péptido	Antagonismo de glucagón	Agonismo de GLP-1
	IC50 (nM, inhibir glucagón 0,5 nM G)	EC50 (nM)
Glucagón	0,005 ± 0,008	
GLP-1		0,005 ± 0,002
[PLA6, E9]Glucagon(6-29) <i>PLA</i>	23,75 ± 4,16	Sin agonismo

TSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 61)		
[PLA6, D9, D28]Glucagon(6-29) <i>PLA</i> TSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 110)	9,03 ± 1,54	746,0 ± 225,7
[E9]Glucagon (2-29) SQGTFTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 111)	340,0 ± 149,0	2719,8 ± 2136,4
[Thr5-O-PLA6, E9]Glucagon(2-29) SQGT (O*)FTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT-NH ₂ (SEQ ID NO: 112)	6,49 ± 2,17	1305,6 ± 241,5
[Thr5-O-PLA6, E9]Glucagon(1-29) HSQGT(O*)FTSEYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT- NH ₂ (SEQ ID NO: 113)	14,19 ± 7,89	721,90 ± 35,5
(O*) representa un enlace depsipéptido		

LISTADO DE SECUENCIAS

[0346]

- 5 <110> DiMarchi, et al.
- <120> Compuestos que muestran actividad antagonista de glucagón y agonista de GLP-1
- 10 <130> 29920-207222 (31135/43852)
- <150> 60/983,766
- <151> 2007-10-30
- 15 <150> 61/090,441
- <151> 2008-08-20
- <160> 118
- 20 <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 29
- 25 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 30 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
- Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
20 25
- 35 <210> 2
- <211> 24
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Polipéptido sintético
- 45 <220>
- <221> MISC_FEATURE
- <223> Análogo de glucagón
- <220>
- 50 <221> MOD_RES
- <222> (1)..(1)
- <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

<400> 2
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 5 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20
 <210> 3
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 15 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 20 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
 20 25 30
 <210> 4
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 30 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
 20 25 30
 35 <210> 5
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <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 <400> 5
 55 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
 60 <210> 6
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 5 <400> 6
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 10 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20
 <210> 7
 <211> 24
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Ser o Glu
 35
 <400> 7
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 40 Phe Val Glu Trp Leu Met Asn Thr
 20
 <210> 8
 <211> 24
 <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> (11)..(11)
 <223> Xaa es Ser o Glu
 65
 <400> 8
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp

```

1           5           10           15
Phe Val Glu Trp Leu Met Lys Thr
      20
5
<210>  9
<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>  (7)..(7)
<223>  Xaa en la posición 7 es Lys o Glu
30
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (10)..(10)
<223>  Xaa es Asp, Glu, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido
homocisteico
35
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (11)..(11)
<223>  Xaa es Ala, Ser, Glu, Lys, ácido homoglutámico o ácido homocisteico
40
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (15)..(15)
<223>  Xaa es Gln, Glu o Lys
45
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (19)..(19)
<223>  Xaa es Ala, Gln, Lys o Glu
50
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (23)..(23)
<223>  Xaa es Asn, Lys o un aminoácido ácido
55
<220>
<221>  MISC_FEATURE
<222>  (24)..(24)
<223>  Xaa es Thr o un aminoácido ácido
60
<400>  9
Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Arg Arg Ala Xaa Asp
1       5           10           15
65
Phe Val Xaa Trp Leu Met Xaa Xaa
      20
<210>  10
<211>  24

```

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <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> (11)..(11)
 <223> Xaa es Ala, Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Gln o Lys
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Ala, Gln o Glu
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Lys o un aminoácido ácido
 35
 <400> 10

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

 <210> 11
 <211> 24
 <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> (11)..(11)
 <223> Xaa es Ala, Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico
 65
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)

<223> Xaa es Gln o Lys
 <400> 11

5 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Xaa Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

10 <210> 12
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

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

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

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

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Lys o Gln

45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(16)
 <223> Xaa es Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Pegilado

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

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado

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

ES 2 558 155 T3

<400> 12

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Xaa Xaa
 1 5 10 15

5 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr
 20

<210> 13
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<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
 30 homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Lys o Gln

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

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> Pegilado

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

50 <400> 13

Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Xaa Xaa
 1 5 10 15

55 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
 20

60 <210> 14
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Lys o Gln

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado

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

 35 <400> 14

 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Xaa Asp
 1 5 10 15

 40 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Asn Thr
 20

 45 <210> 15
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 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, ácido homoglutamínico o ácido homocisteico

 65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)

<223> Xaa es Lys o Glu
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico
 <220>
 10 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Ala, Ser, Glu, Lys Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico
 <220>
 15 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Arg, Gln, Glu o Lys
 <220>
 20 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Ala, Gln, Lys o Glu
 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Lys o un aminoácido ácido
 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido
 <400> 15
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Arg Arg Ala Xaa Asp
 1 5 10 15
 45 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20
 <210> 16
 <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> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 5 <223> Xaa es Glu o Asp

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 15 <223> Xaa es Asn, Asp o Glu

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 20 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 16
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 25 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Thr
 20

30 <210> 17
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 50 <223> Xaa es Asp o Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 55 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 65 <223> Xaa es Asn, Asp o Glu

<220>
 <221> MOD_RES

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

 <400> 17
 5 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Thr
 10 20
 <210> 18
 <211> 24
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

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

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

 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp o Glu

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es Ser o Glu

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19

 <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, Asp o Glu

 <220>
 55 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

 <400> 18
 60 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Xaa Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Glu Trp Leu Xaa Xaa Thr
 65 20
 <210> 19
 <211> 24

<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
 <222> (7)..(7)
 10 <223> Xaa es Lys o Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 15 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 20 <223> Xaa es Ala, Ser, Glu, Lys Gln, ácido homoglutámico u homocisteína

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 25 <223> Xaa es Arg, Gln, Glu o Lys

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 30 <223> Xaa es Ala, Gln, Lys o Glu

<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, Lys, Asp, Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico

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

50 <400> 20
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Arg Arg Ala Xaa Asp
 1 5 10 15

55 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20

<210> 21
 <211> 10
 60 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fragmento de péptido que representa los 10 aminoácidos carboxi

terminal de Exendin-4

<400> 21

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

<210> 22

<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> MISC_FEATURE

<222> (7)..(11)

<223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

35

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, homoácido glutámico y ácido

homocisteico

40

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (22)..(22)

<223> Xaa es Met, Leu o Nle

45

<400> 22

50

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

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asn Thr
20

55

<210> 23

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

60

<220>

<223> Polipéptido sintético

65

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

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, homoácido glutámico y ácido homocisteico

 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

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

 25 <400> 23

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

 <210> 24
 35 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 40 <223> Polipéptido sintético

 <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, homoácido glutámico y ácido homocisteico
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 65
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 5 <400> 24
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 10 Phe Val Glu Trp Leu Xaa Asn Thr
 20
 <210> 25
 <211> 24
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o ácido
 homocisteico
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, homoácido glutámico y ácido
 40 homocisteico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(24)
 45 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 19 y 24
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 50 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 <400> 25
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 55 1 5 10 15
 Phe Val Glu Trp Leu Xaa Lys Thr
 20
 60 <210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <223> Fragmento de péptido que representa los 8 aminoácidos carboxi terminal de oxintomodulina

5 <400> 26
 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 1 5

10 <210> 27
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <223> Fragmento de péptido que representa los 4 aminoácidos carboxi del carboxi terminal de oxintomodulina

<400> 27

25 Lys Arg Asn Arg
 1

<210> 28
 <211> 34
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

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

40 <400> 28
 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

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

Pro Ser

50 <210> 29
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

<400> 29

65 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

<223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <223> Análogo de glucagón
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 10 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 15 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11
 <400> 32
 20 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 25 Pro Ser
 <210> 33
 <211> 34
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <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> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15
 50 <400> 33
 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 55 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 Pro Ser
 60 <210> 34
 <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 <400> 34
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

15 Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

<210> 35
 <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> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

40 <400> 35
 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

45 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

<210> 36
 <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> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

ES 2 558 155 T3

<400> 36

5 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

10 <210> 37
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

<400> 37

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

Arg Arg Ala Arg Glu Phe Ile Lys Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly
 20 25 30

30 <210> 38
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 50 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 38

55 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

60 <210> 39
 <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> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico

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

 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

 30 <400> 39

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

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

 45 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

 <400> 40

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

 60 <210> 41
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 65 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<223> Análogo de glucagón
 <400> 41

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

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

<220>
 <223> Polipéptido sintético

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

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> 2-butirolactona unida a través de grupo tiol de cisteína

30 <400> 42

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 35 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

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

<220>
 <223> Polipéptido sintético

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

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> Grupo carboximetilo unido a través de grupo tiol de cisteína

55 <400> 43

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 60 1 5 10 15
 Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20 25

<210> 44
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 44

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

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

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 45
 <211> 35
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

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

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

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

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

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

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

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Lys, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Xaa es Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)

<223> Pegilado

<400> 45

5 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

10 Pro Pro Ser
 35

<210> 46
 15 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 20 <223> Polipéptido sintético

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

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

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

35 homocisteico

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

40 homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

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

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Lys, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr, Asp, Glu, ácido cisteico and ácido homocisteico

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa es Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

65

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Pegilado
 5 <400> 46
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 10 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro
 20 25 30
 15 Pro Ser Xaa
 35
 <210> 47
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Análogo de glucagón
 <220>
 30 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o
 ácido homocisteico
 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Glu o Asp
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Asp o Glu
 55 <400> 47
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 60 Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Thr
 20
 <210> 48
 <211> 24
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Polipéptido sintético

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

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 15 <223> Xaa es Asp o Glu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 20 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 30 <223> Xaa es Asn, Asp o Glu

<400> 48

35 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Thr
 20

40 <210> 49
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

<400> 49

55 Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp Phe
 1 5 10 15

Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

60 <210> 50
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Fragmento de péptido que representa los 10 aminoácidos carboxi
 terminal de Exendin-4 más un aminoácido adicional
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa se selecciona del grupo que consiste en Cys, Orn, Lys,
 10 homocisteína y acetyl fenilalanina
 <400> 50
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa
 15 1 5 10
 <210> 51
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 25 <220>
 <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, ácido
 homoglutamínico o ácido homocisteico
 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa es Lys o Glu
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutamínico o ácido
 homocisteico
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 55 <223> Xaa es Ala, Ser, Glu, Lys Gln, ácido homoglutamínico o ácido
 homocisteico
 <220>
 60 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Arg, Gln, Glu o Lys
 <220>
 65 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(19)
 <223> Xaa es Ala, Gln, Lys o Glu
 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (22)..(22)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Asn, Lys o un aminoácido ácido
 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Thr, Gly o un aminoácido ácido
 15 <400> 51
 Phe Thr Ser Xaa Tyr Ser Xaa Tyr Leu Xaa Xaa Arg Arg Ala Xaa Asp
 1 5 10 15
 20 Phe Val Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20
 <210> 52
 <211> 6
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 35 <400> 52
 His Ser Gln Gly Thr Xaa
 1 5
 40 <210> 53
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 <400> 53
 55 Ser Gln Gly Thr Xaa
 1 5
 <210> 54
 60 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico

 <400> 54
 5 Gln Gly Thr Xaa
 1

 <210> 55
 10 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 15 <223> Polipéptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 20 <223> Xaa es ácido fenil láctico

 <400> 55

 Gly Thr Xaa
 25 1

 <210> 56
 <211> 2
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico

 40 <400> 56

 Thr Xaa
 1

 45 <210> 57
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 50 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona de un 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
 60

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 65 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Ser, D-serina,
 D-alanina, Val, Gly, N-metil serina, N-metil alanina, y
 ácido aminoisobutírico (AIB)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Glu o Gln
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 10
 <400> 57
 Xaa Xaa Xaa Gly Thr Xaa
 1 5
 15
 <210> 58
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Ser, D-serina,
 D-alanina, Val, Gly, N-metil serina, N-metil alanina, y
 ácido aminoisobutírico (AIB)
 30
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Glu o Gln
 35
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 40
 <400> 58
 Xaa Xaa Gly Thr Xaa
 1 5
 45
 <210> 59
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Glu o Gln
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 65
 <400> 59
 Xaa Gly Thr Xaa
 1

<210> 60
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido A
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 25
 <400> 60
 30 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20
 35
 <210> 61
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido B
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 55
 <400> 61
 60 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
 65
 <210> 62
 <211> 24
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido C
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(7)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 4 y 7
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 25
 <400> 62
 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 30 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20
 <210> 63
 <211> 28
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido D
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 55
 <400> 63
 Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 60 Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20 25
 <210> 64
 <211> 28
 65 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>

<223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <223> Peptido E
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 10 <223> Treonina en posición 4 y ácido fenil láctico en posición 5 están
 unidos por enlace éster
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 <220>
 <221> MOD_RES
 25 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 <400> 64
 30 Ala Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20 25
 35 <210> 65
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <223> Peptido F
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 50 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 <220>
 <221> MOD_RES
 55 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 <400> 65
 60 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20 25
 65 <210> 66
 <211> 28
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 5
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido G
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 <223> Treonina en posición 4 y ácido fenil láctico en posición 5 están
 unidos por enlace éster
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 20
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 25
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 30
 <400> 66
 Ser Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 35 Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20 25
 <210> 67
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido H
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Unido covalentemente a un grupo ácido de colesterol
 60
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 a 15
 65
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)

ES 2 558 155 T3

<223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 <400> 67

5 Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

10 <210> 68
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido I

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

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (25)..(25)
 <223> Unido covalentemente a un grupo ácido de colesterol

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (25)..(25)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 68

45 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys
 20 25

50 <210> 69
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido J

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

<220>

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

5 <210> 71
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido L

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

20 <400> 71

Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

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

30 Pro Ser

<210> 72
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido M

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

50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

55 <400> 72

Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

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

Pro Ser

65 <210> 73
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido N

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 and 15

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 73

20 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

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

Pro Ser

30 <210> 74
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido O

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

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 74

60 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

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

65 Pro Ser

<210> 75

<211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> Peptido P
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 15 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 20 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 25 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 <400> 75
 30 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 Asp Thr
 20
 35 <210> 76
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 45 <223> Peptido Q
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 50 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 55 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 60 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 <400> 76
 65 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

<210> 77
 <211> 24
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido R

 15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Grupo amino N-terminal sustituido por grupo hidroxilo

 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19

 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

 30 <400> 77
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

 35 Phe Val Glu Trp Leu Met Asp Thr
 20

 40 <210> 78
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido S

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

 55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (19)..(23)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 19 y 23

 60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

 65 <400> 78
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

Phe Val Glu Trp Leu Met Lys Thr
20

5 <210> 79
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético

15 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Peptido T

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

25 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (7)..(11)
<223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

30 <220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 79

35 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Gln Ala Ala Lys Asp
1 5 10 15

Phe Ile Ala Trp Leu Met Asp Thr
20

40 <210> 80
<211> 24
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Polipéptido sintético

50 <220>
<221> MISC_FEATURE
<223> Peptido U

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

60 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (11)..(15)
<223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

65 <220>
<221> MOD_RES
<222> (24)..(24)
<223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 80

ES 2 558 155 T3

Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Gln Ala Ala Lys Glu
 1 5 10 15
 Phe Ile Ala Trp Leu Met Asp Thr
 5 20
 <210> 81
 <211> 28
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido V
 20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 30 <400> 81
 Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15
 Arg Ala Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 35 20 25
 <210> 82
 <211> 28
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 45 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido W
 50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19
 55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 60 <400> 82
 Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asp Thr
 65 20 25
 <210> 83
 <211> 29

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 5 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido X
 10
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> Lactam bridge connection residues 16 y 20
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 20
 <400> 83

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

 30 <210> 84
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido Y
 40
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16)..(20)
 <223> Lactam bridge connecting bridges 16 y 20
 45
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 50
 <400> 84

 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15
 55 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asp Thr
 20 25

 60 <210> 85
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 65 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 <220>

<221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido Z

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(17)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 13 y 17

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (26)..(26)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

15 <400> 85
 Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala
 1 5 10 15

20 Lys Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20 25

25 <210> 86
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 <223> Treonina en posición 5 y ácido fenil láctico en posición 6 unidos mediante enlace éster

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(19)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 15 y 19

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

50 <400> 86
 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg
 1 5 10 15

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

60 <210> 87
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AB

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 5 <223> Treonina en posición 5 y ácido fenil láctico en posición 6 unidos mediante enlace éster

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (16)..(20)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 16 y 20

<220>
 <221> MOD_RES
 20 <222> (29)..(29)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 87

25 His Ala Glu Gly Thr Xaa Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
 1 5 10 15

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

30 <210> 88
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AC

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

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

55 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado

60 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 88

65 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

Phe Val Cys Trp Leu Met Asp Thr

20

5 <210> 89
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

15 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AD

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

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(11)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 7 y 11

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Pegilado

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

35 <400> 89
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

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

45 Pro Ser Cys
 35

50 <210> 90
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AE

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

70 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

75 <220>

ES 2 558 155 T3

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

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

10 <400> 90
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

15 Phe Val Cys Trp Leu Met Asp Thr
 20

<210> 91
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AF

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

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Pegilado

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

50 <400> 91
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

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

Pro Ser Cys
 35

60 <210> 92
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 93

5 Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

10 <210> 94
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 20 <223> Peptido AI

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 30 <223> Unido a ácido graso C16 a través de un residuo de Glu

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

<400> 94

40 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

45 <210> 95
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 55 <223> Peptido AJ

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 65 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (19)..(19)
 <223> Unido a ácido graso C16 a través de un residuo de Glu

 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

 <400> 95
 10 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Lys Trp Leu Met Asp Thr
 15 20

 <210> 96
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AK

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

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24)..(24)
 <223> Unido a ácido graso C16 a través de un residuo de Glu

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

 <400> 96
 50 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Lys
 55 20

 <210> 97
 <211> 24
 <212> PRT
 60 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

 65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AP

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es ácido amino isobutírico
 10

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

<400> 97
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15
 20
 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

<210> 98
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25

<220>
 <223> Polipéptido sintético
 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AR
 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)
 45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es ácido alfa isobutírico
 50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 55

<400> 98
 Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Xaa Asp
 1 5 10 15
 60
 Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr
 20

<210> 99
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AS

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

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

<400> 99

20 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

25 <210> 100
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AU

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 sustituido por amida

<400> 100

50 Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Thr
 20

55 <210> 101
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AV

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(7)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 4 y 7

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es ácido alfa isobutírico

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Carboxilato C-terminal susituado por amida

15 <400> 101
 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

20 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

<210> 102
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AW

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(7)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 4 y 7

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Xaa es ácido alfa isobutírico

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> Carboxilato C-terminal susituado por amida

50 <400> 102
 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa Arg Arg Ala Gln Asp
 1 5 10 15

55 Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 20

<210> 103
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AX

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

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 10 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

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

<400> 103

20 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

25 <210> 104
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AY

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 sustituido por amida

<400> 104

50 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Gln Ala Ala Lys Glu
 1 5 10 15

Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr
 20

55 <210> 105
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AZ

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (34)..(34)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 105

5 Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

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

Pro Ser

15 <210> 106
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido BA

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

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(5)
 <223> Unido a ácido graso C16 a través de un residuo de Glu

40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7)..(7)
 <223> Unido a ácido graso C16 a través de un residuo de Glu

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

<400> 106

50 Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr
 20

55 <210> 107
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa1 se selecciona de un 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

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Ser, D-serina,
 D-alanina, valina, glycina, N-metil serina, y ácido aminoisobutírico
 (AIB)

10 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Glu o Gln

15 <400> 107
 Xaa Xaa Xaa Thr Gly Phe
 1 5

20 <210> 108
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Polipéptido sintético

30 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Ser, D-serina,
 D-alanina, valina, glycina, N-metil serina, y ácido aminoisobutírico
 (AIB)

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Glu o Gln

40 <400> 108
 Xaa Xaa Thr Gly Phe
 1 5

45 <210> 109
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Polipéptido sintético

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> Xaa se selecciona de un grupo que consiste en Glu o Gln

60 <400> 109
 Xaa Thr Gly Phe
 1

65 <210> 110
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AL

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

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

<400> 110

20 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
 20

25 <210> 111
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AM

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

<400> 111

45 Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Glu 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

50 <210> 112
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AN

65 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (4)..(5)
 <223> Treonina en la posición 4 y ácido fenil láctico en la posición 5
 unidos mediante un enlace éster

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

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (28)..(28)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 10

<400> 112
 Ser Gln Gly Thr Xaa Thr Ser Glu 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> 113
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Polipéptido sintético
 25

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Peptido AO
 30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (5)..(6)
 <223> Treonina en la posición 5 y ácido fenil láctico en la posición 6
 35 unidos mediante un enlace éster

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa es ácido fenil láctico
 40

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29)..(29)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 45

<400> 113
 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 25

<210> 114
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 55

<220>
 <223> Polipéptido sintético
 60

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

<220>

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

 5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

 10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Pegilado a través de espaciador rígido

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

 20 <400> 116
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

 25 Phe Val Lys Trp Leu Met Asp Thr
 20

 30 <210> 117
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético

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

 40 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15

 45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Pegilado

 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida

 55 <400> 117
 Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Arg Arg Ala Lys Asp
 1 5 10 15

 60 Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro
 20 25 30

 Gly Pro Cys
 35
 65 <210> 118
 <211> 35
 <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> (11)..(15)
 <223> Puente de lactama que conecta los residuos 11 y 15
 15
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Pegilado
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (35)..(35)
 <223> Alfa carboxilato C-terminal sustituido por amida
 25
 <400> 118

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 51, en el que los aminoácidos en las posiciones 4 y 7, o las posiciones 7 y 11, o las posiciones 11 y 15, o las posiciones 15 y 19, o las posiciones 19 y 23 de la SEQ ID NO: 51 están unidos a través de un puente de lactama; en el que el aminoácido C-terminal del antagonista de glucagón/agonista de GLP-1 comprende un grupo amida en lugar del grupo ácido carboxílico del aminoácido nativo.
- 10 2. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21, 26, 27 o 50, unido al aminoácido 24 de dicho antagonista de glucagón/agonista de GLP-1.
- 15 3. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 1 ó 2, que comprende un grupo hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 16 ó 19 de la SEQ ID NO: 51, y sales farmacéuticamente aceptables de dicho antagonista de glucagón/agonista de GLP-1.
- 20 4. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID Nos: 5-9, 12-14 y 22-25.
- 25 5. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID Nos: 16-19, 32, 33, 35, 36, 45-48, 60, 62, 64, 74-79, 89, 91-93, 95 y 115-118.
- 30 6. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID Nos: 2, 10, 11, 15, 20, 34, 38, 39, 61, 72, 94, 99, 105, 110.
- 35 7. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 1, que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID Nos: 66, 70, 86, 87, 112 y 113.
- 40 8. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 3, en el que el grupo hidrófilo es una cadena de polietilenglicol (PEG).
- 45 9. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 7, en el que la cadena de PEG tiene un peso molecular dentro del intervalo de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 Daltons.
- 50 10. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según la reivindicación 7, en el que la cadena de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20000 Daltons a aproximadamente 40000 Daltons.
- 55 11. Multímero o dímero que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o un conjugado que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un grupo conjugado, opcionalmente, en el que el grupo conjugado es un péptido o polipéptido heterólogo, un agente de reconocimiento, una inmunoglobulina o parte de la misma, un marcador de diagnóstico, un polímero u otro agente terapéutico o de diagnóstico.
12. Conjugado, según la reivindicación 11, en el que el péptido o polipéptido heterólogo es una proteína plasmática.
13. Composición farmacéutica estéril que comprende un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, un multímero o dímero o conjugado, según la reivindicación 11 ó 12, o una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Composición farmacéutica estéril, según la reivindicación 13, en la que la composición farmacéutica es una composición acuosa preformulada.
15. Antagonista de glucagón/agonista de GLP-1, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, multímero o dímero o conjugado, según la reivindicación 11 ó 12, o una combinación de los mismos, para utilizar en el tratamiento de hiperglicemia o diabetes, en la supresión del apetito, la reducción del aumento de peso, o la inducción de la pérdida de peso en un paciente.

Fig. 1: Estabilidad de glucagón Cys 21-maleimidoPEG5K (37°C)

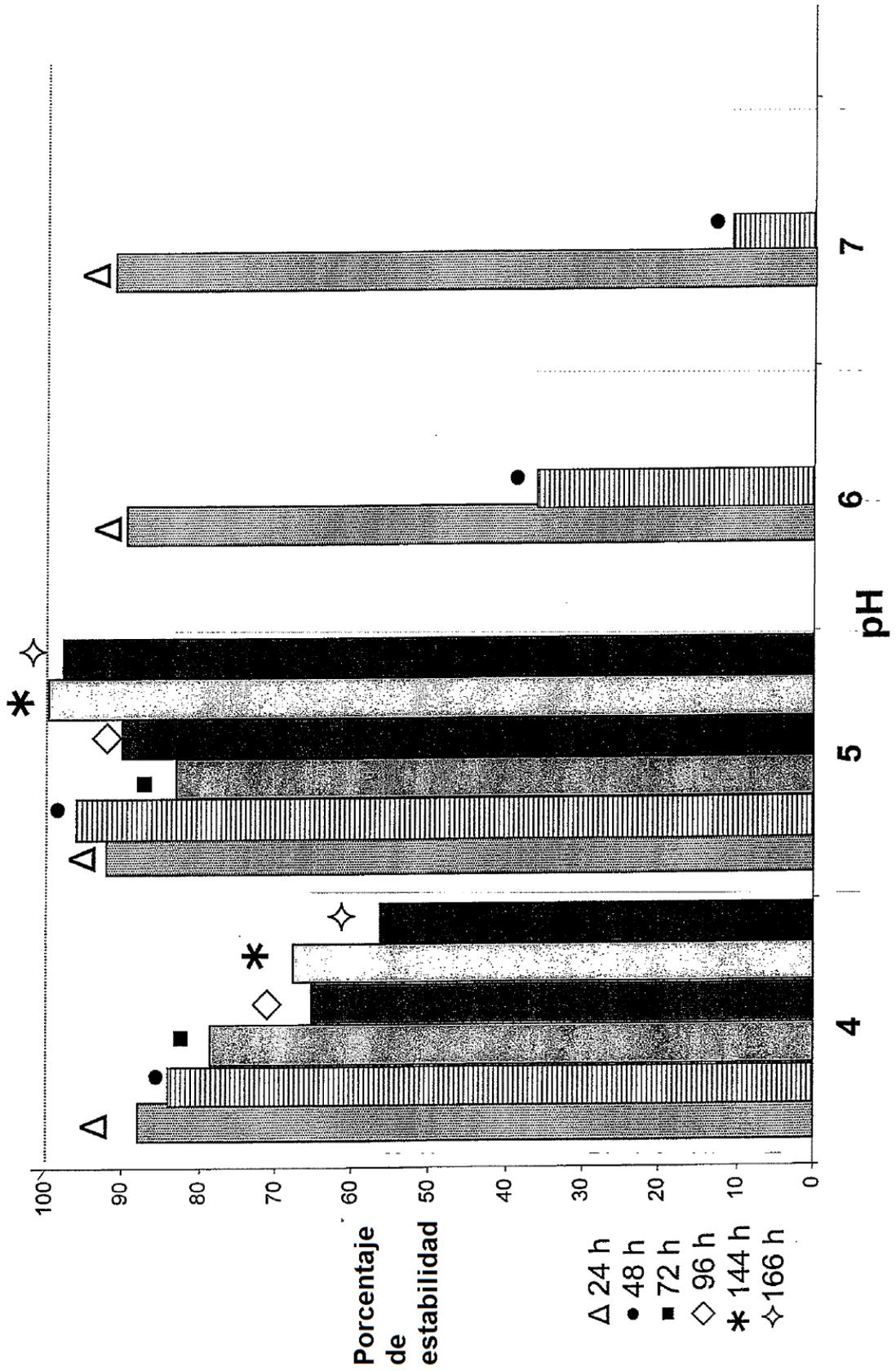
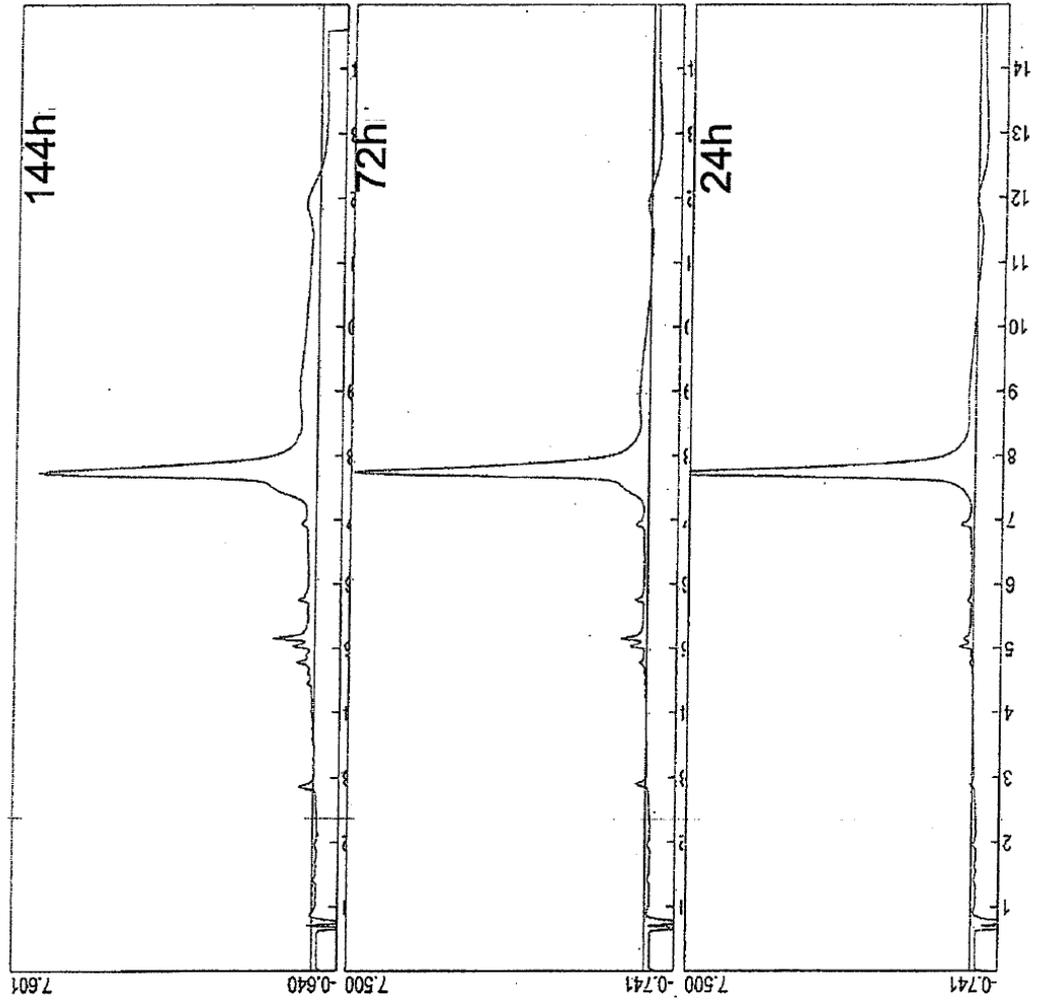


Fig. 2: Análisis por HPLC de Glucagón Cys21-maleimidoPEG5K a pH 5 (37°C)



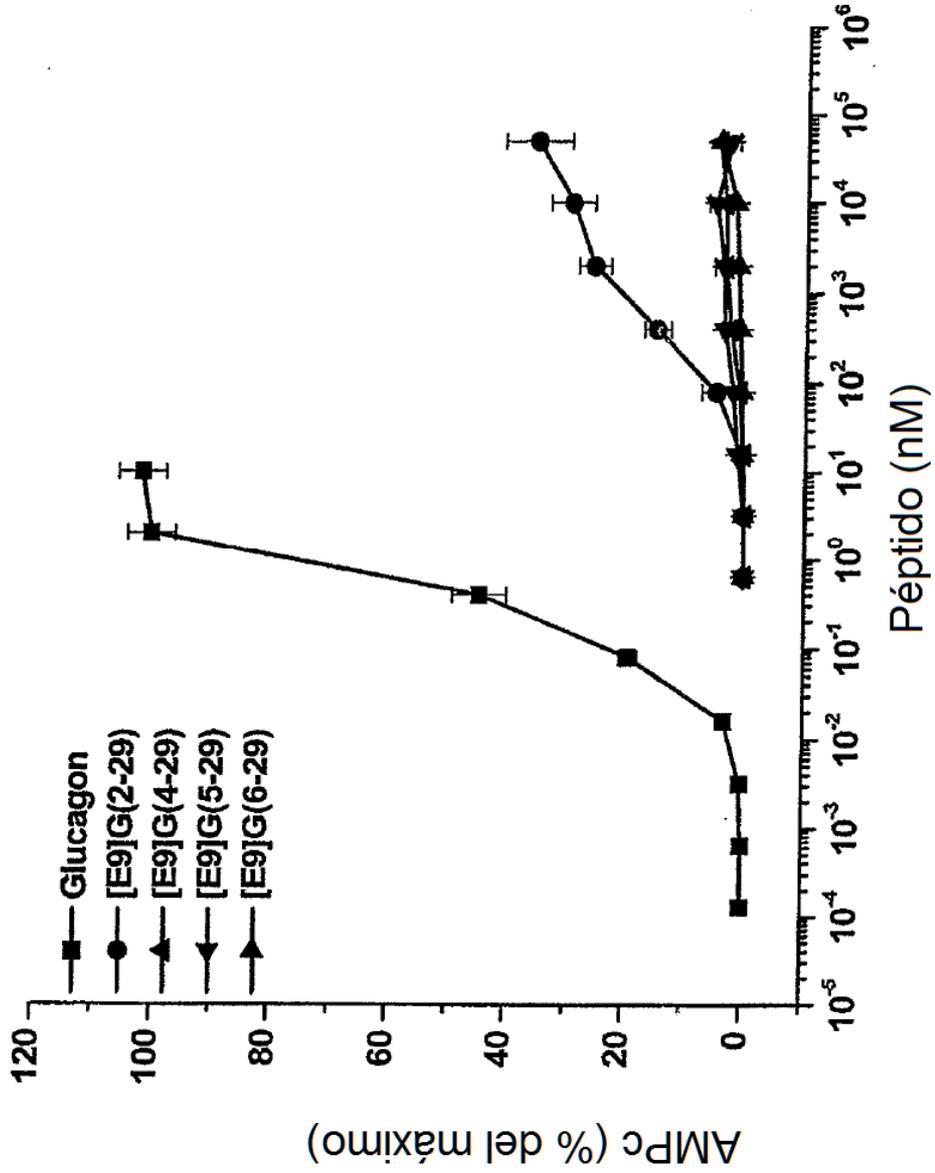


Fig. 3A

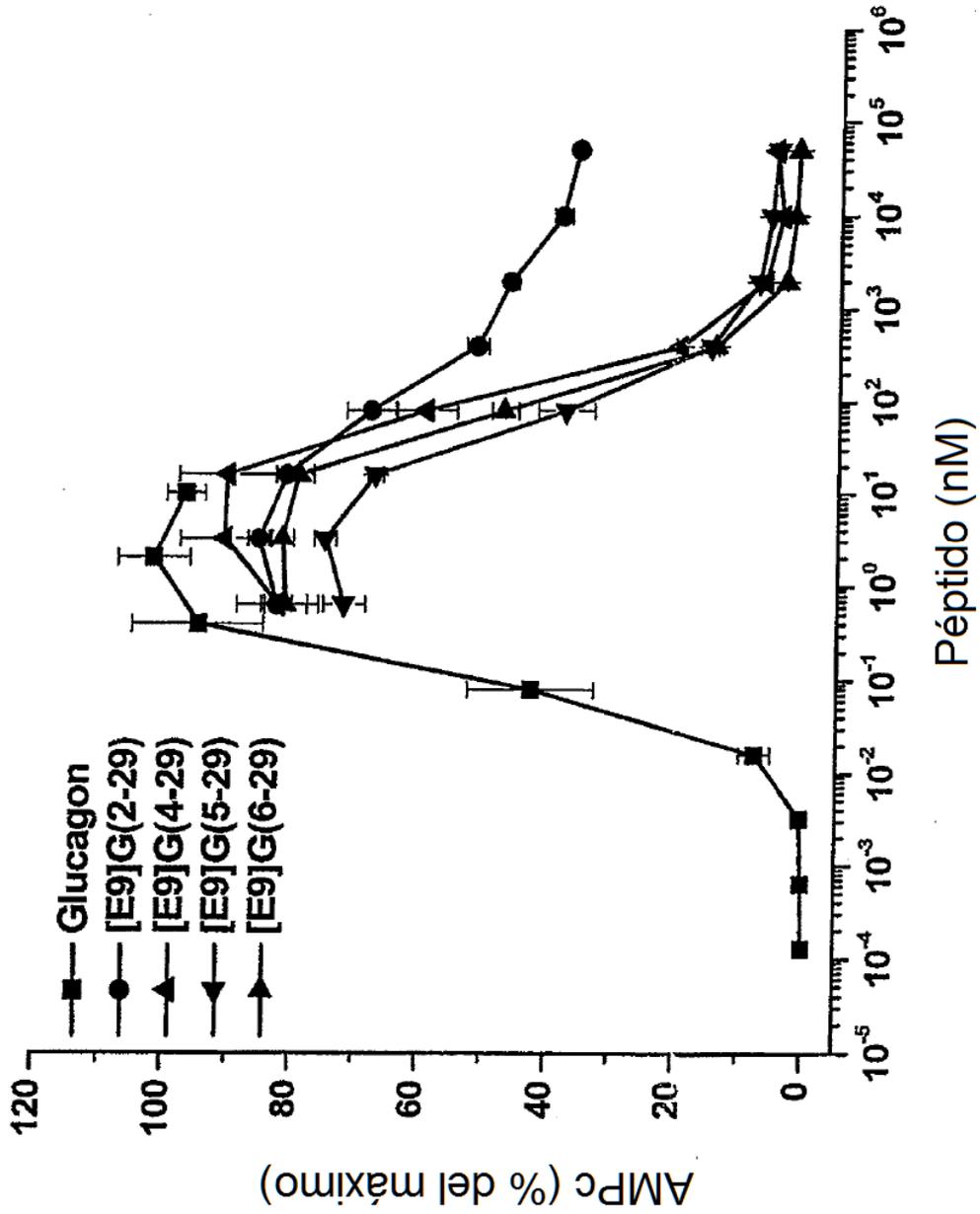
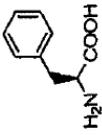
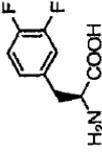
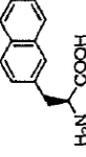
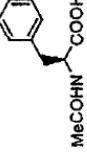
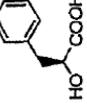
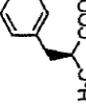
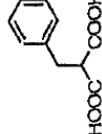


Fig. 3B

Fig. 4 Péptidos de glucagón (6-29) con modificación de la posición 6

Péptido	Residuo 6	IC ₅₀ (nM) (unión a receptor)	AMPc	
			pA ₂	IC ₅₀ (nM)*
[E ⁹]G(6-29)-NH ₂		36.35 ± 5.23	7.16 ± 0.27	97.2
[3,4-2(F)-F ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		36.70 ± 0.54	7.35±0.08	133.0
[2-Nal ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		95.16±1.32	7.17±0.64	41.2
[Ac-F ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂		37.09±0.26	6.67±0.63	149.8
[PLA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (PLA: ácido 3-fenil láctico)		12.34± 0.13	7.67±0.30	42.2
[MCA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (MCA: ácido alfa-metilhidrocinámico)		114.4±5.76	6.90±0.83	46.6
[BMA ⁶ , E ⁹]G(6-29)-NH ₂ (BMA: ácido bencilmalónico)		80.56± 17.91	6.43±1.44	234.8

* Normalizado para la inhibición de la liberación de AMPc inducida con glucagón 0,2 nM

AMPC mediada por receptor de GLP-1

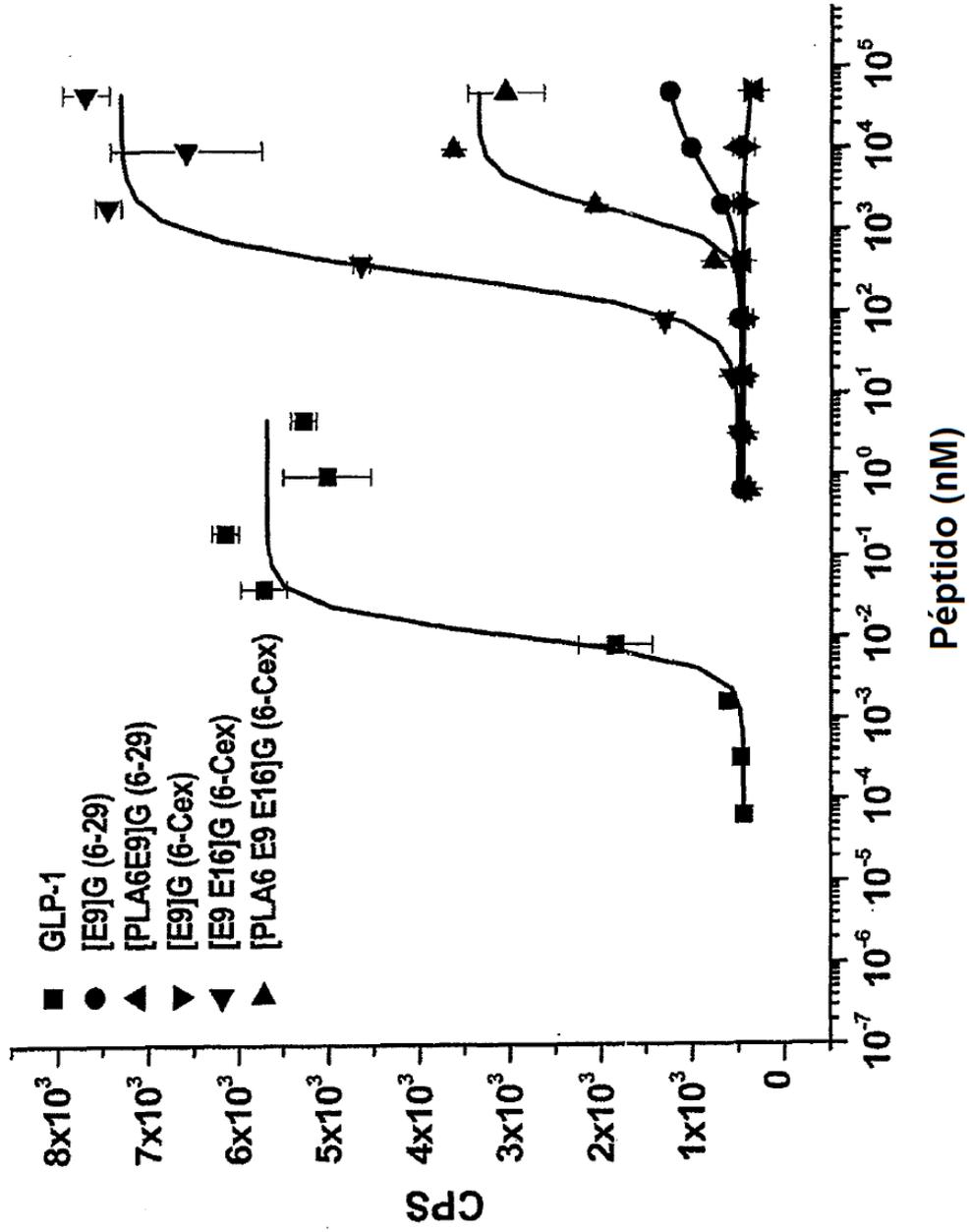


Fig. 5

Inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,8 nM

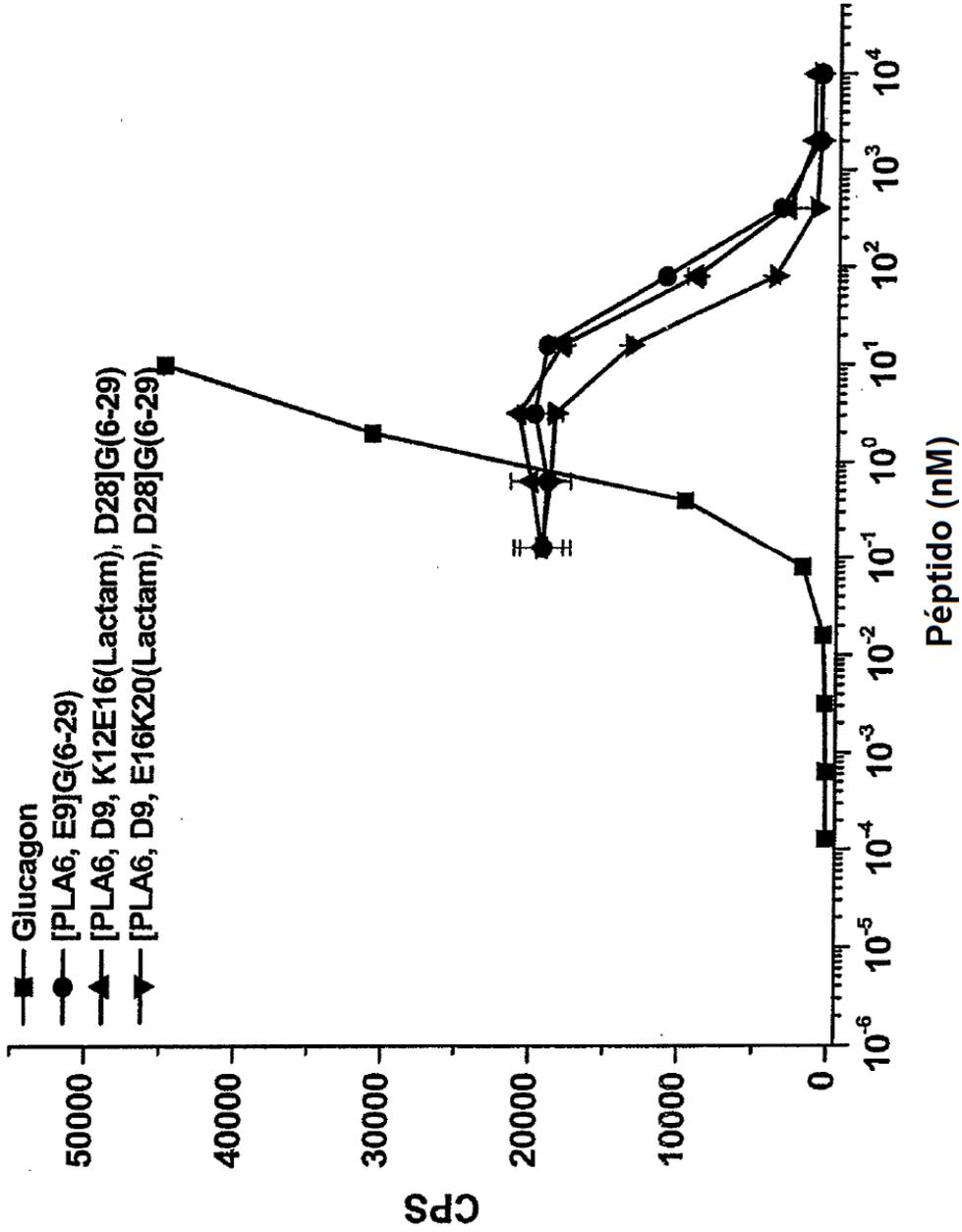
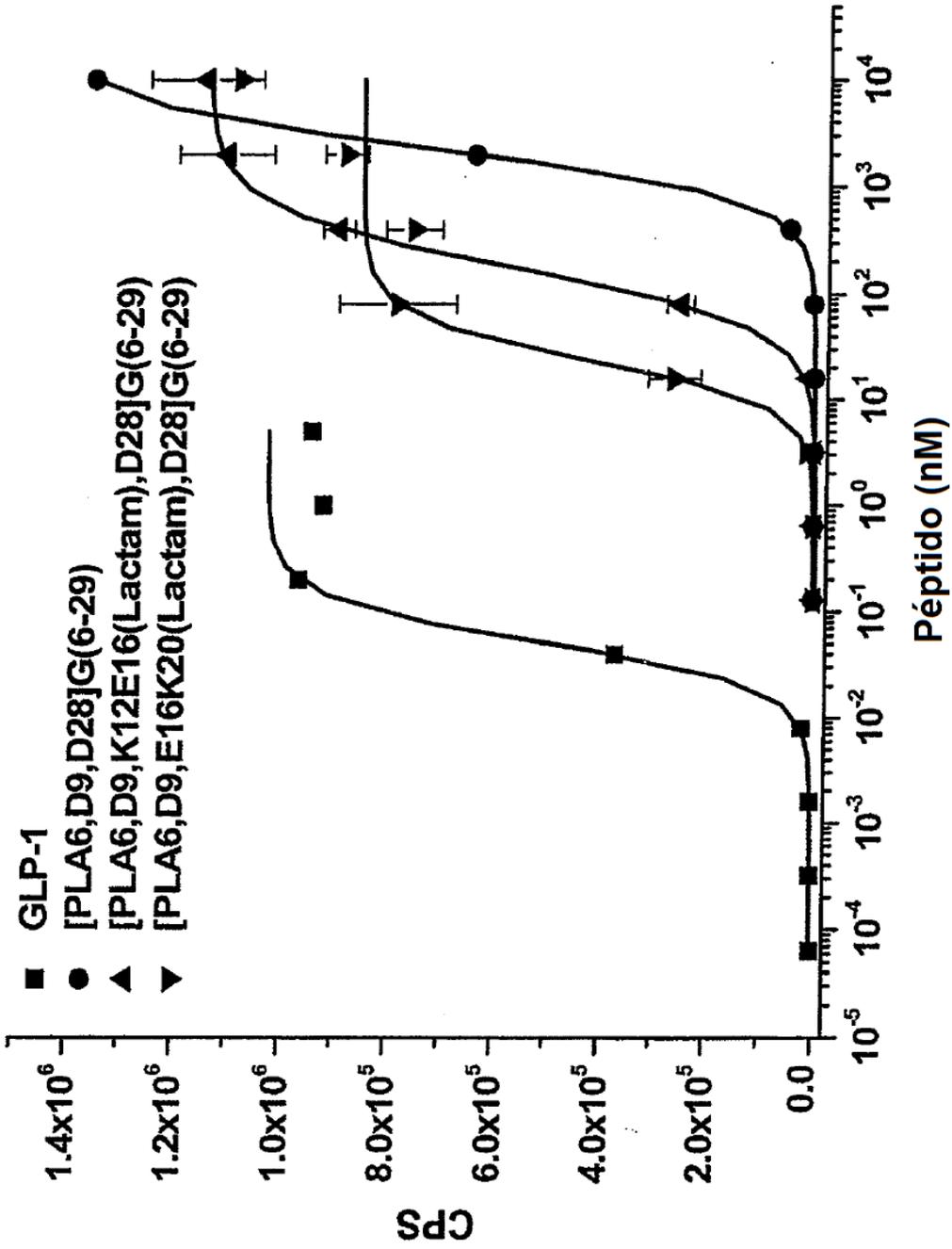


Fig. 6A

Señales de AMpc estimuladas por GLP-1



Lactam = Lactama

Fig. 6B

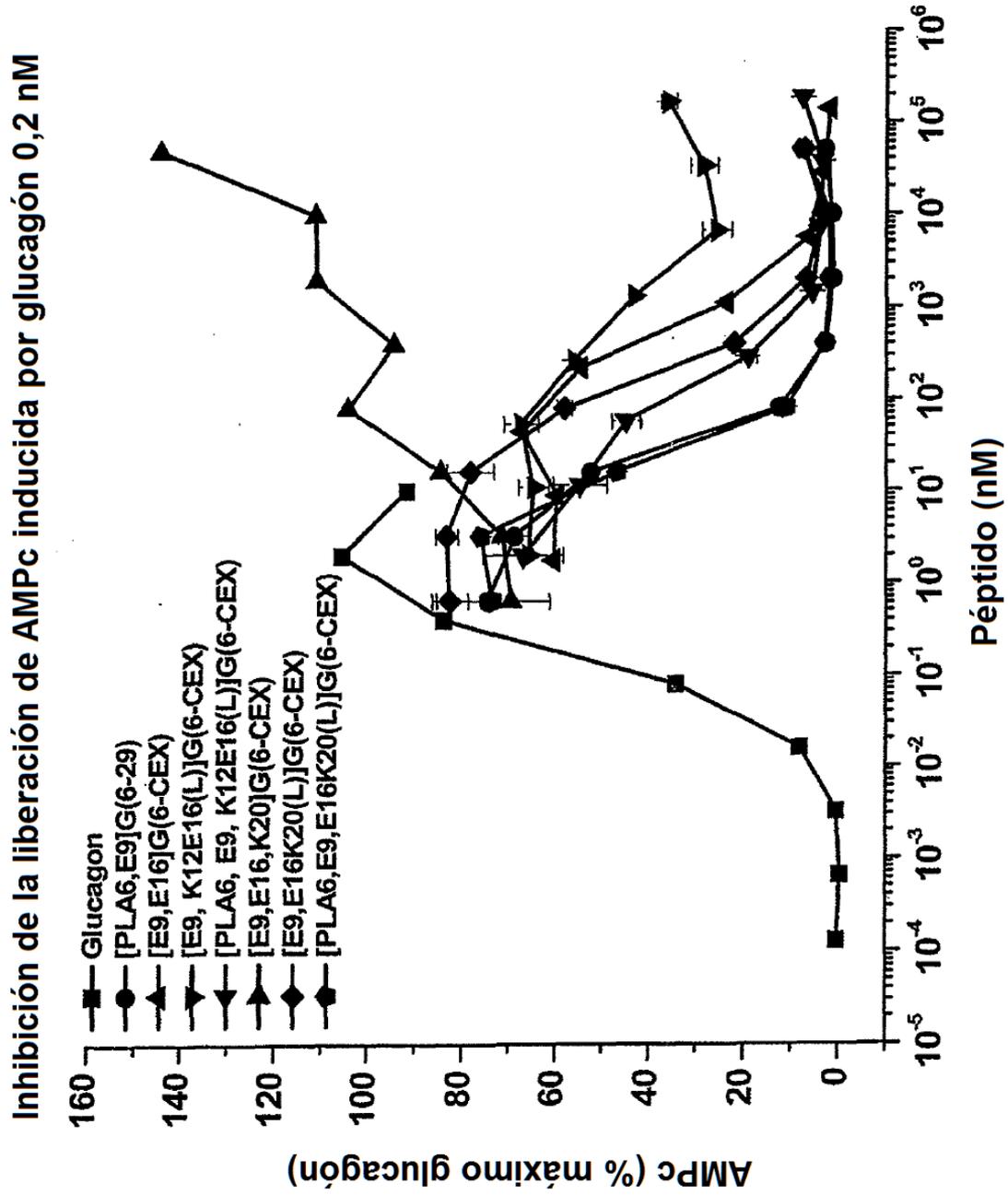


Fig. 7A

Liberación de AMPc estimulada por el receptor de GLP-1

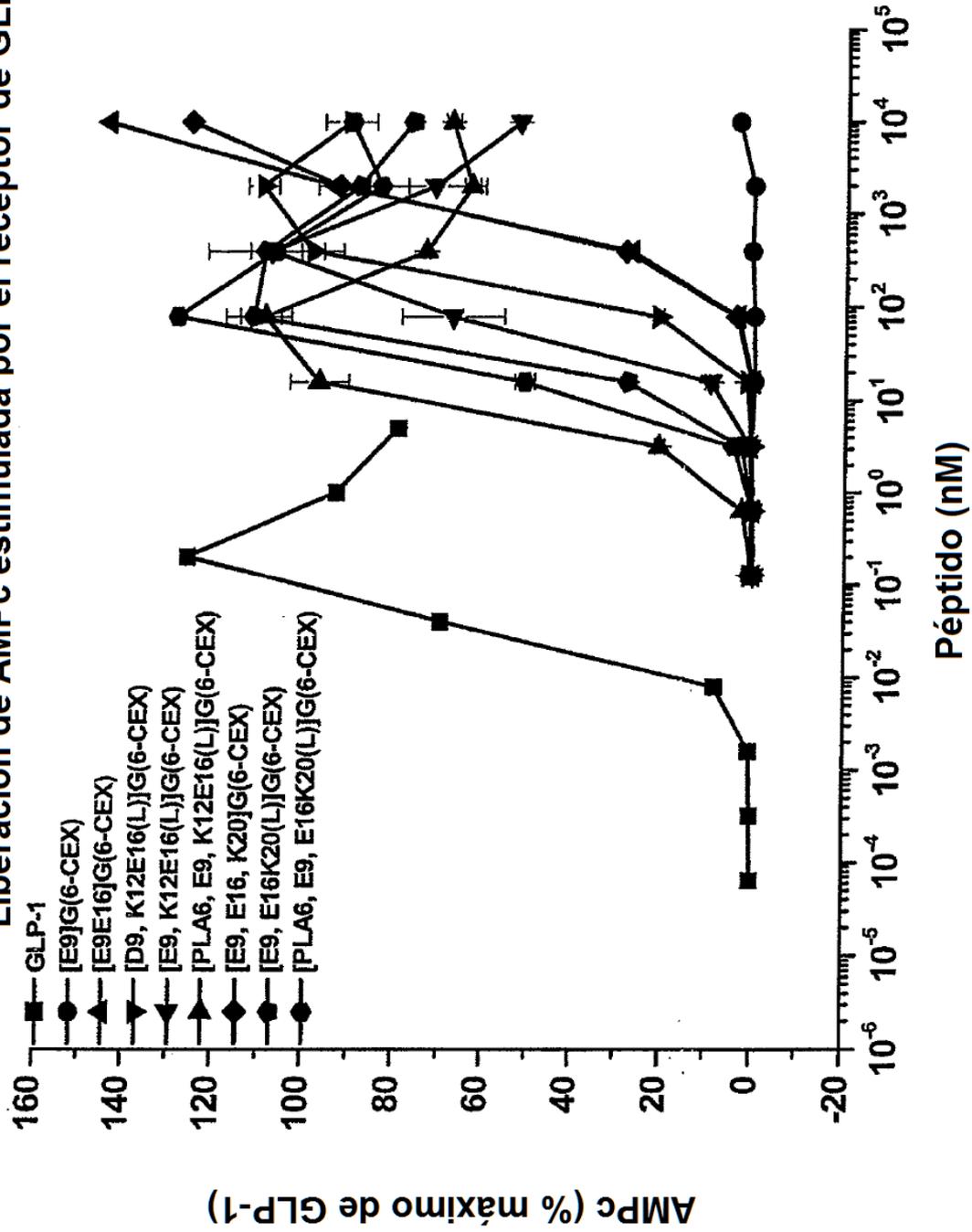


Fig. 7B

Inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,8 nM

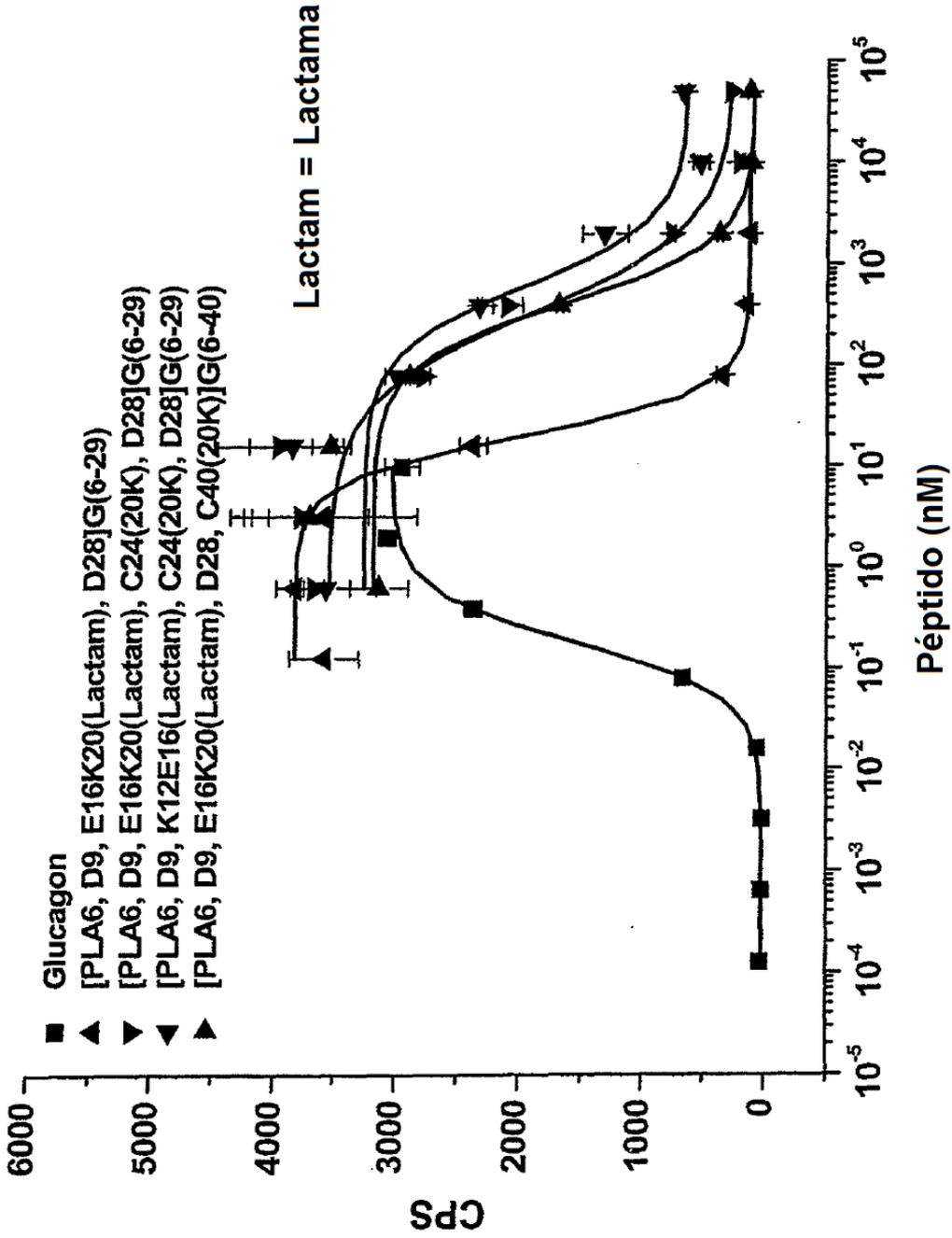


Fig. 8A Péptidos con lactama PEGilados que muestran antagonismo de glucagón

Señales de AMPc estimuladas por GLP-1

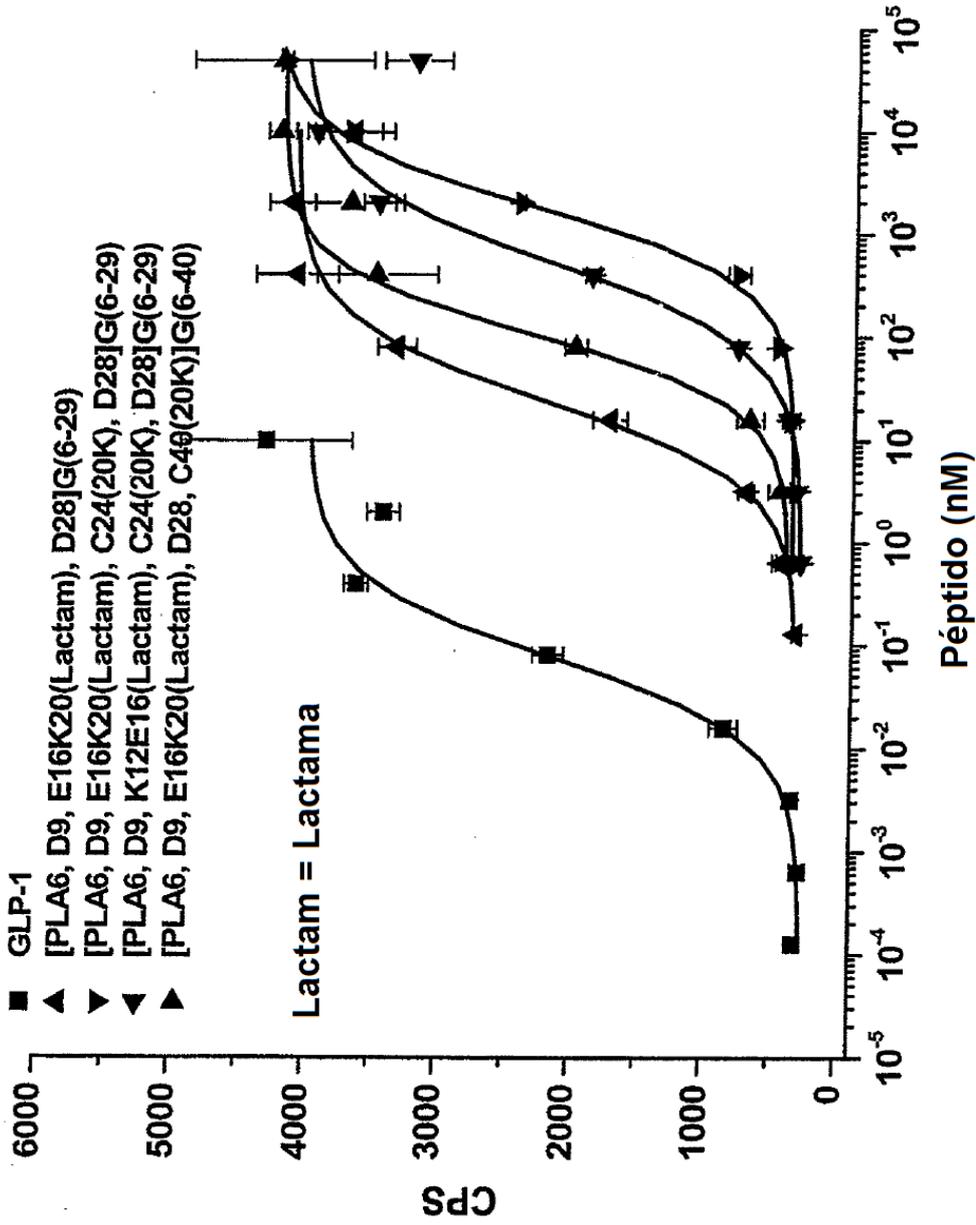


Fig. 8B Péptidos con lactamas PEGilados muestran agonismo de GLP-1

Inhibición de la liberación de AMPc inducida por glucagón 0,8 nM

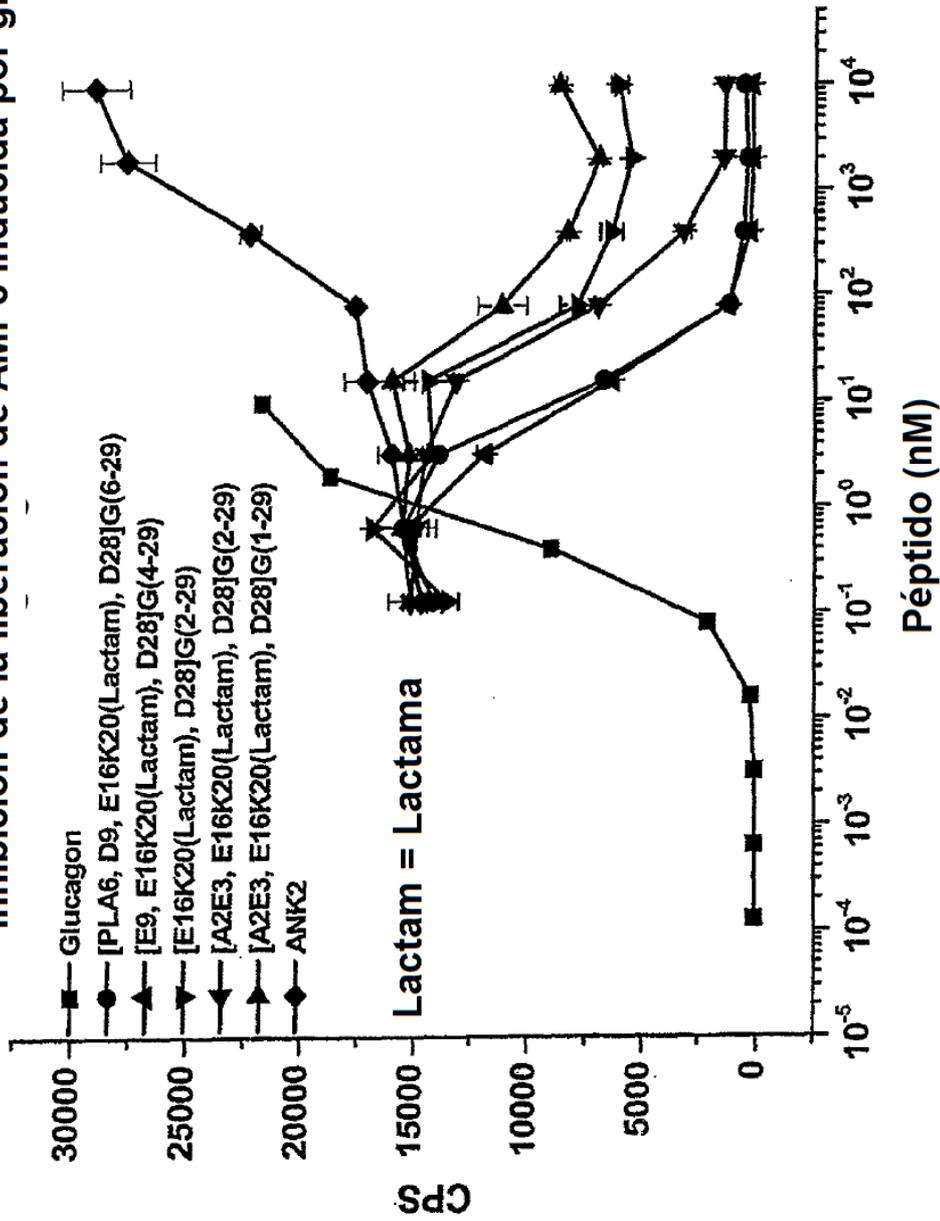


Fig. 9A Péptidos Lactama (E16-K20)glucagón (1-29, 2-29 y 4-29) muestran antagonismo de glucagón

Inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón

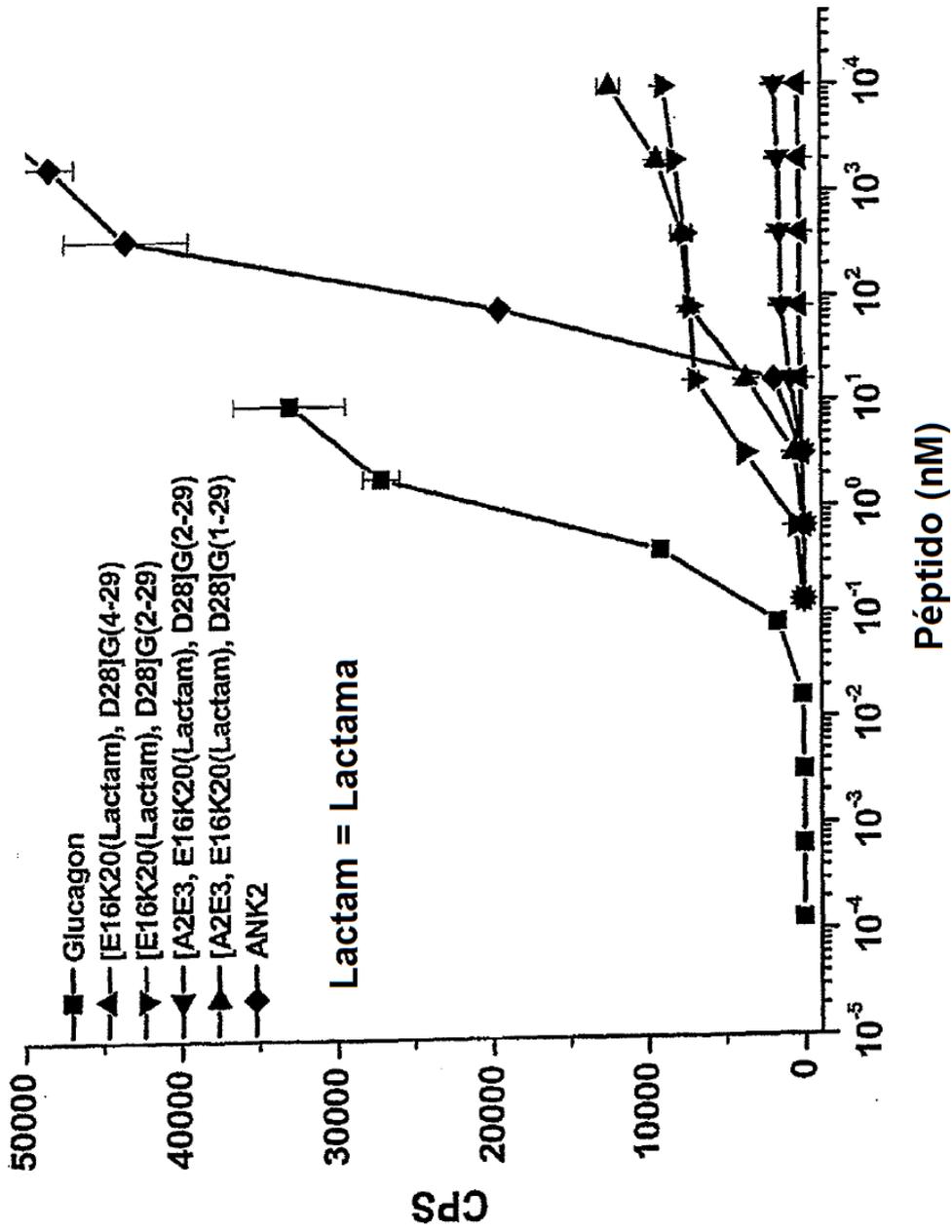


Fig. 9.B Liberación de AMPc inducida por péptidos con lactama (1-29, 2-29, 4-29)

AMPC estimulado por receptor de GLP-1

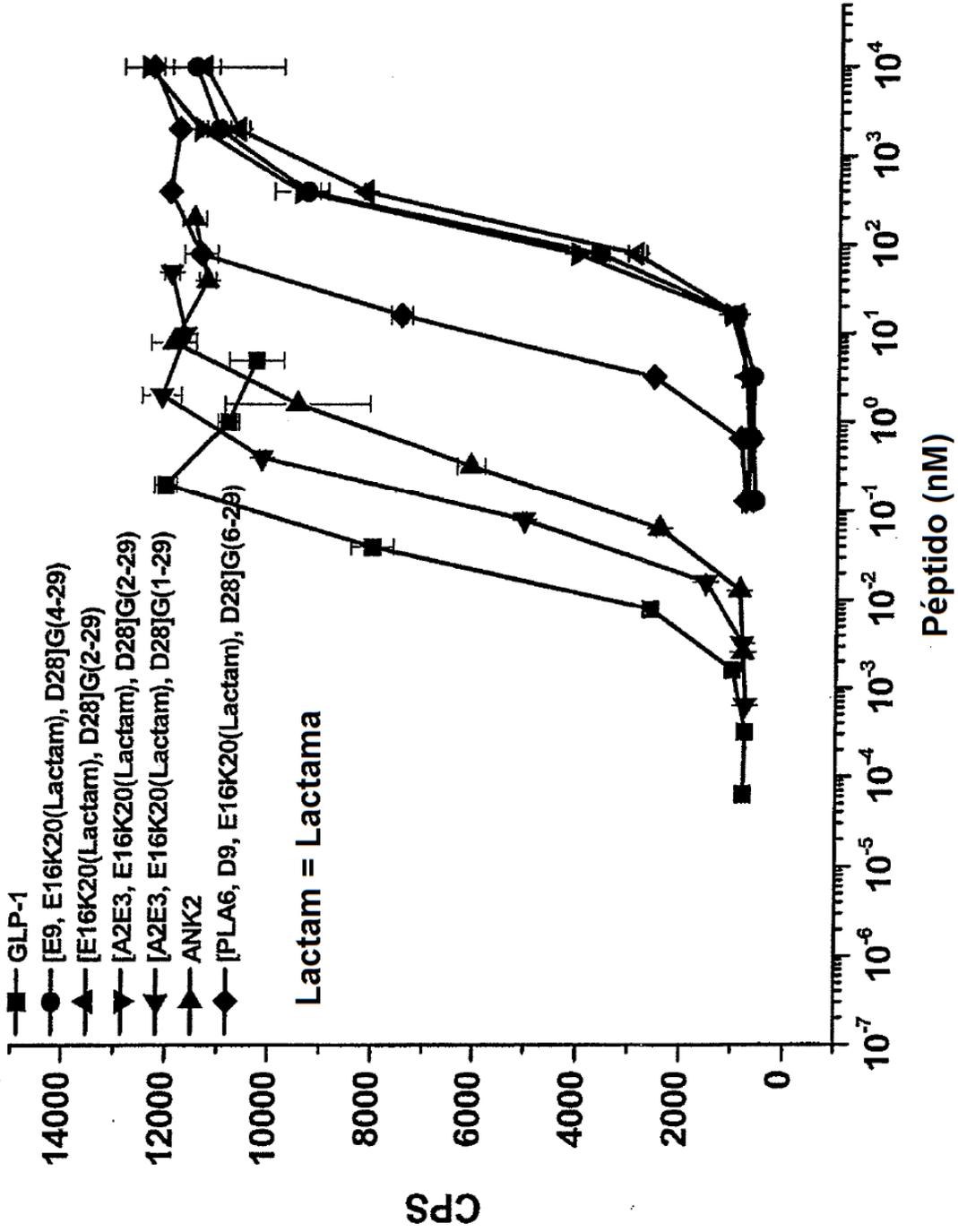


Fig. 9C Péptidos lactama (E16-K20) glucagón (1-29, 2-29 y 4-29) muestran agonismo de GLP-1