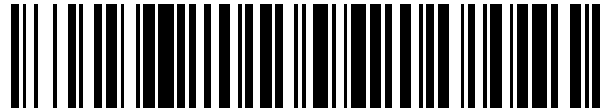


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 558 842**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/605** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2009 E 09800752 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2300035**

54 Título: **Agonistas mixtos a base de GIP para el tratamiento de trastornos metabólicos y obesidad**

30 Prioridad:

**20.08.2008 US 90448 P**  
**17.06.2008 US 73274 P**  
**10.02.2009 US 151349 P**  
**03.07.2008 US 78171 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**09.02.2016**

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. y  
MA, TAO**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 558 842 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

Agonistas mixtos a base de GIP para el tratamiento de trastornos metabólicos y obesidad

## 5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

10 [0001] Esta solicitud reivindica prioridad de las siguientes: la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 61/073.274 presentada el 17 de junio de 2008, la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 61/078.171 presentada el 3 de julio de 2008, la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 61/090.448 presentada el 20 de agosto de 2008, y la solicitud de patente provisional de EE.UU. Nº 61/151.349 presentada el 10 de febrero de 2009.

## ANTECEDENTES

15 [0002] 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.

25 [0003] Cuando la glucosa en la sangre comienza a disminuir, el glucagón, una hormona producida por el páncreas, señala al hígado a descomponer el glucógeno y liberar glucosa, causando que los niveles de glucosa en la sangre se eleven hasta un nivel normal. GLP-1 tiene diferentes actividades biológicas en comparación con el 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 observado que GLP-1 reduce la hiperglucemia (niveles elevados de glucosa) en los 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 GLP-1 y del mismo modo se ha demostrado que reduce la hiperglucemia en los diabéticos.

30 [0004] El péptido insulínotropo dependiente de glucosa (GIP) es un péptido regulador gastrointestinal de 42 aminoácidos que estimula la secreción de insulina de las células beta pancreáticas en presencia de glucosa. Se deriva por procesamiento proteolítico de un precursor de 133 aminoácidos, preproGIP.

## 35 DESCRIPCIÓN RESUMIDA

[0005] Tal como se describe en el presente documento, se proporcionan péptidos de glucagón que son análogos de glucagón nativo (SEQ ID N°: 1) y que presentan actividad GIP. La invención también proporciona métodos de uso de tales péptidos.

40 [0006] El glucagón nativo no activa el receptor de GIP, y normalmente tiene aproximadamente 1% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1. Las modificaciones a la secuencia de glucagón natural descrito en el presente documento producen péptidos de glucagón que pueden exhibir una actividad glucagón potente equivalente o mejor que la actividad de glucagón natural (SEQ ID NO: 1), una actividad GIP potente equivalente a o mejor que la actividad de GIP nativo (SEC ID NO: 4), y/o una actividad de GLP-1 potente equivalente a o mejor que la actividad de GLP-1 nativo. La GLP-1 (7-36) amida (SEQ ID NO: 3) o GLP-1 (7-37) (ácido) (SEQ ID NO: 2) son formas biológicamente potentes de GLP-1, que demuestran actividad esencialmente equivalente en el receptor de GLP-1.

50 [0007] Los datos descritos en este documento muestran que los péptidos que tienen tanto actividad GIP como actividad GLP-1 son particularmente ventajosos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso, así como para el tratamiento de la hiperglucemia, incluyendo la diabetes. Los datos in vivo descritos en este documento demuestran que la combinación de la actividad agonista de GIP con actividad agonista de GLP-1 produce un mayor efecto en la reducción de peso que GLP-1 solo. Esta actividad es particularmente inesperada en vista de las enseñanzas en la técnica que antagonizar GIP es deseable para reducir la ingesta de alimentos diaria y el peso corporal, y el aumento de sensibilidad a la insulina y el gasto energético. (Irwin et al, Diabetologia 50: 1532-1540 (2007); y Althage et al, J Biol Chem, e-publicación del 17 de abril de 2008).

60 [0008] Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona métodos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso, que implican administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de un compuesto, por ejemplo, un péptido de glucagón, que presenta actividad tanto en el GIP receptor como en el receptor de GLP-1, y que opcionalmente también muestra actividad en el receptor de glucagón. Tales compuestos incluyen los co-agonistas GIP/GLP-1 y los tri-agonistas glucagón/GIP/GLP-1 descritos en el presente documento.

65 [0009] El aumento de actividad en el receptor de GIP es proporcionada por una modificación de aminoácidos en la posición 1. Por ejemplo, His en la posición 1 está sustituida por un aminoácido grande aromático, opcionalmente Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, cloro-Phe, sulfo-Phe, 4-piridil-Ala, metil-Tyr, o 3-amino Tyr.

**[0010]** El aumento de actividad en el receptor de GIP es proporcionada por modificaciones que estabilizan la estructura de hélice alfa de la parte C-terminal (aminoácidos 12-29) del péptido de glucagón o análogo del mismo. Por ejemplo, puede formarse un puente intramolecular por un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , o entre las posiciones  $k$  y  $k + 7$ . En realizaciones de ejemplo, el puente es entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, 24 y 28, ó 17 y 20. En otras realizaciones, las interacciones no covalentes tales como puentes salinos se pueden formar entre aminoácidos cargados positiva y negativamente en estas posiciones. Alternativamente, por ejemplo, la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón (alrededor de aminoácidos 12-29) se logra mediante la introducción intencionada de uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituídos en posiciones que mantienen la actividad deseada. En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 de un péptido de glucagón o análogo del mismo está sustituido por un aminoácido alfa, alfa disustituído. Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 de un péptido de glucagón o análogo del mismo por ácido aminoisobutírico (AIB) proporciona una hélice alfa estabilizada en ausencia de un puente salino o lactama. Dichos péptidos se consideran en el presente documento como un péptido que carece de un puente intramolecular. En aspectos específicos, la estabilización de la hélice alfa se lleva a cabo mediante la introducción de uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituídos sin introducción de un puente covalente intramolecular, por ejemplo, un puente de lactama, un puente disulfuro. Dichos péptidos se consideran en el presente documento como un péptido que carece de un puente intramolecular covalente. En algunas realizaciones, uno, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas con AIB.

**[0011]** El aumento de actividad en el receptor de GIP es proporcionada por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 27 y/o 28, y opcionalmente en la posición 29. Por ejemplo, la Met en la posición 27 está sustituida por un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 está sustituido por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y la Thr en la posición 29 está sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Gly.

**[0012]** El aumento de actividad en el receptor de GIP también es proporcionado por una modificación de aminoácidos en la posición 12. Por ejemplo, la posición 12 está sustituida por un aminoácido alifático grande no polar, opcionalmente Ile.

**[0013]** El aumento de actividad en el receptor de GIP también es proporcionado por una modificación de aminoácidos en las posiciones 17 y/o 18. Por ejemplo, la posición 17 está sustituida por un residuo polar, opcionalmente Gln, y la posición 18 está sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala.

**[0014]** El aumento de actividad en el receptor de glucagón es proporcionado por una modificación de aminoácidos en la posición 16 de glucagón nativo (SEQ ID NO: 1) como se describe en el presente documento.

**[0015]** La actividad reducida, mantenida, o aumentada en el receptor de glucagón es proporcionada, por ejemplo, por una modificación de aminoácidos en la posición 3 como se describe en el presente documento.

**[0016]** La restauración de la actividad de glucagón que se ha reducido por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y/o 2 es proporcionada por modificaciones que estabilizan la estructura de hélice alfa de la parte C-terminal (aminoácidos 12 a 29) del péptido de glucagón o análogo del mismo. Por ejemplo, puede formarse un puente intramolecular por un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , o entre las posiciones  $k$  y  $k + 7$ . En otras realizaciones, se pueden formar interacciones no covalentes, tales como puentes salinos, entre los aminoácidos cargados positiva y negativamente en estas posiciones. En aún otras realizaciones, se insertan o sustituyen uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituídos en esta parte C-terminal (aminoácidos 12-29) en las posiciones que conservan la actividad deseada. Por ejemplo, uno, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas por un aminoácido alfa, alfa-disustituído, por ejemplo, AIB.

**[0017]** El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal con un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster.

**[0018]** El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 es proporcionada por modificaciones que estabilizan la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal (alrededor de aminoácidos 12-29) del péptido de glucagón o análogo del mismo. En algunas realizaciones, un puede formarse un puente intramolecular por un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , o entre las posiciones  $k$  y  $k + 7$ . En otras realizaciones, se pueden formar interacciones no covalentes, tales como puentes salinos, entre los aminoácidos cargados positiva y negativamente en estas posiciones. En aún otras realizaciones, se insertan o sustituyen uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituídos en esta parte C-terminal (aminoácidos 12-29) en las posiciones que conservan la actividad deseada. Por ejemplo, uno, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas por un aminoácido alfa, alfa- disustituído, por ejemplo, AIB.

**[0019]** El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 es proporcionado por una modificación de aminoácidos en

la posición 20 como se describe aquí.

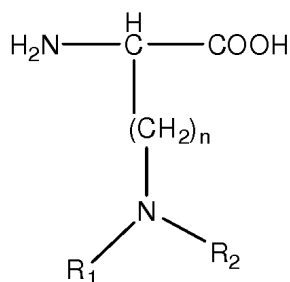
**[0020]** El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 es proporcionado por la adición de un péptido de extensión C-terminal tal como GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96) al extremo C-terminal. La actividad de GLP-1 en tales análogos se puede aumentar aún más mediante la modificación del aminoácido en la posición 18, 28 o 29, o en la posición 18 y 29, como se describe en el presente documento.

**[0021]** Un aumento más modesto en la potencia de GLP-1 es proporcionado por la modificación del aminoácido en la posición 10 a un de aminoácido grande aromático, opcionalmente Trp.

**[0022]** La actividad reducida en el receptor de GLP-1 es proporcionada, por ejemplo, por una modificación de aminoácidos en la posición 7, una delección de aminoácido o aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28, produciendo un péptido de 27 ó 28 aminoácidos, o una combinación de los mismos, como se describe en el presente documento.

**[0023]** La preservación de la actividad después de la pegilación es proporcionada por la adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) al extremo C-terminal.

**[0024]** Como se ha demostrado en el presente documento, la actividad mantenida o aumentada en cada uno de receptor de glucagón, receptor de GLP-1, y receptor de GIP (en comparación con un análogo a base de glucagón activo de GIP que contiene lactama) es proporcionada por (i) una sustitución de aminoácido de Ser en la posición 16 por un aminoácido de fórmula IV:



[Fórmula IV],

en la que n es de 1 a 16, o de 1 a 10, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o 2 a 6, o 2 o 3 o 4 o 5, cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)OH, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)NH<sub>2</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)SH, (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), (alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)(heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)R<sub>7</sub>, y (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)(heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>), en el que R<sub>7</sub> es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre, y (ii) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 por un aminoácido alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 16 es Lys y el aminoácido en la posición 20 es AIB.

**[0025]** La actividad en cada uno de receptor de glucagón, receptor de GLP-1 y receptor de GIP del análogo que comprende un aminoácido de fórmula IV en la posición 16 y una aminoácido alfa, alfa-disustituido en la posición 20 puede mejorarse aún más mediante la ampliación de la longitud del péptido, por ejemplo, por fusión con un péptido de extensión C-terminal, por ejemplo, de aproximadamente 1-21 aproximadamente 9 a 21, aproximadamente 6-18, aproximadamente 9-12, o aproximadamente 10 u 11 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el C-terminal se extiende por fusión a GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), en el que X es Gly o un aminoácido pequeño, alifático o no polar o ligeramente polar. En realizaciones alternativas, el C-terminal se extiende por fusión a GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) y se fusionan 1-11 aminoácidos (por ejemplo, 1-5, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 aminoácidos) con el extremo C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95). Los aminoácidos 1-11 en el C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) pueden comprender, por ejemplo, uno o más aminoácidos pequeños alifáticos, tales como Ala o Gly. En este sentido, la extensión C-terminal puede ser, por ejemplo, GPSSGAPPPSX<sub>m</sub>, en donde m es de 1 a 11 (por ejemplo, 1 a 5) y X es Ala o Gly. Alternativamente, el 1 a 11 (por ejemplo, 1 a 5) aminoácidos fusionados al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 95 puede ser una combinación de diferentes aminoácidos alifáticos pequeños. Por ejemplo, el 1 al 11 (por ejemplo, 1 a 5) aminoácidos pueden ser una combinación de restos de Ala y Gly.

**[0026]** La mejora de la actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP de un análogo a base de glucagón, activo de GIP, incluyendo un análogo que comprende un aminoácido de fórmula IV en la posición 16 y un aminoácido alfa, alfa-disustituido en la posición 20, se puede lograr además tras la acilación o alquilación de un aminoácido situado dentro de una extensión C-terminal o en el aminoácido C-terminal (por ejemplo, un aminoácido que se añade al extremo C-terminal de la extensión C-terminal). La acilación o alquilación pueden ser de un aminoácido situado en, por ejemplo, cualquiera de las posiciones 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42,

43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y 50. En algunas realizaciones, el aminoácido que está acilado o alquilado se encuentra en la posición 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43. En algunas realizaciones, el aminoácido alquilado o acilado es una Lys que está unido a un grupo acilo o alquilo, por ejemplo C10-C22. En ciertas realizaciones, la Lys se encuentra C-terminal a una extensión C-terminal que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95, tal que la Lys se encuentra en la posición 40 del análogo. Opcionalmente, los péptidos extendidos Por C-terminal acilados también se pegilan, por ejemplo en la posición 24.

**[0027]** La mejora de la actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP de un análogo a base de glucagón, activo de GIP, puede conseguirse además mediante acilación o alquilación de un aminoácido a través de un espaciador (por ejemplo, un aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador hidrófilo bifuncional, espaciador hidrófobo bifuncional). En algunas realizaciones, el análogo a base de glucagón activo de GIP, comprende un grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, cuyo espaciador está unido a la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 o la posición 40 del análogo. En otras realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal de 1 a 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29 y el espaciador, que está unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo, está unido a un aminoácido de la extensión en una posición correspondiente a una de las posiciones 37-43 en comparación con la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el espaciador es de 3 a 10 átomos de longitud. En aspectos específicos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 átomos de longitud. Los espaciadores adecuados para los propósitos de aumentar la actividad en uno o más de los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP se describen adicionalmente en este documento.

**[0028]** Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente que aumentan o disminuyen la actividad de GIP, que aumentan o disminuyen la actividad del receptor de glucagón, y que aumentan o disminuyen la actividad del receptor de GIP-1 se pueden aplicar individualmente o en combinación. Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente también se puede combinar con otras modificaciones que confieren otras propiedades deseables, tales como aumento de la solubilidad y/o estabilidad y/o duración de la acción. Alternativamente, cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente se puede combinar con otras modificaciones que no afectan sustancialmente la solubilidad o estabilidad o actividad. Las modificaciones de ejemplo incluyen pero no se limitan a:

(A) mejorar la solubilidad, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más aminoácidos cargados a la parte C-terminal de glucagón natural, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. Dicho aminoácido cargado se puede introducir mediante la sustitución de un aminoácido nativo por un aminoácido cargado, por ejemplo, en las posiciones 28 ó 29, o alternativamente mediante la adición de un aminoácido cargado, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En realizaciones de ejemplo, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todos de aminoácidos cargados están cargados positivamente. Tales modificaciones aumentan la solubilidad, por ejemplo, proporcionan al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o más solubilidad con respecto al glucagón nativo a un pH determinado entre aproximadamente 5,5 y 8, por ejemplo, pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C.

(B) aumentar la solubilidad y la duración de la acción o la vida media en circulación mediante la adición de un grupo hidrófilo, tal como una cadena de polietilenglicol, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo en la posición 16, 17, 20, 21, 24 o 29, dentro de una extensión C-terminal, o en el aminoácido C-terminal del péptido,

(C) aumentar la solubilidad y/o la duración de la acción o la vida media en circulación y/o retrasar el comienzo de la acción por acilación o alquilación del péptido de glucagón, tal como se describe en el presente documento;

(D) aumentar la duración de la acción o la vida media en circulación a través de la introducción de la resistencia a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) mediante modificación del aminoácido en la posición 1 o 2 como se describe en este documento.

(E) aumentar la estabilidad mediante modificación del Asp en la posición 15, por ejemplo, por delección o sustitución por ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. Tales modificaciones pueden reducir la degradación o la escisión en un pH dentro del intervalo de 5,5 a 8, por ejemplo, reteniendo al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, hasta 100% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace peptídico entre Asp15-Ser16.

(F) aumentar la estabilidad por modificación de la Ser en la posición 16, por ejemplo por sustitución por Thr o AIB. Tales modificaciones también reducen la escisión del enlace peptídico entre Asp15-Ser16.

(G) aumentar la estabilidad por modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, por sustitución por leucina o norleucina. Tales modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa. La estabilidad también se puede aumentar mediante modificación de la Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, mediante la sustitución por Ala, Ser, Thr, o AIB. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln. La estabilidad puede aumentarse mediante la modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, mediante la sustitución por Glu. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio cíclico de succinimida seguido por isomerización a iso-aspartato.

(H) sustituciones, adiciones o delecciones no conservativas o conservativas que no afectan sustancialmente la actividad, por ejemplo, sustituciones conservativas en una o más de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29; sustitución de una o más de estas posiciones por Ala; delección de los aminoácidos en una o más de las posiciones 27, 28 o 29; o delección del aminoácido 29 combinado opcionalmente con una amida o éster C-terminal en lugar del grupo ácido carboxílico C-terminal; sustitución de Lys en la posición 12 por Arg; sustitución de Tyr en la posición 10 por Val o Phe;

**[0029]** En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento presentan una EC50 para la actividad de activación del receptor de GIP de aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento presentan una EC50 en el receptor de GIP que es de aproximadamente 0,001 nM, 0,01 nM, o 0,1 nM. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento presentan una EC50 en el receptor de GIP de no más de aproximadamente 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 8 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 75 nM, o 100 nM. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón presentan una EC50 para la activación del receptor de glucagón de aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento presentan una EC50 en el receptor de glucagón que es de aproximadamente 0,001 nM, 0,01 nM, o 0,1 nM. En algunas realizaciones, la EC50 en el receptor de glucagón es no más de aproximadamente 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 8 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 75 nM, o 100 nM. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón presentan una EC50 para la activación del receptor de GLP-1 de aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento presentan una EC50 en el receptor de GLP-1 que es de aproximadamente 0,001 nM, 0,01 nM, o 0,1 nM. En algunas realizaciones, la EC50 en el receptor de GLP-1 es no más de aproximadamente 1 nM, 2 nM, 3 nM, 4 nM, 5 nM, 6 nM, 8 nM, 10 nM, 15 nM, 20 nM, 25 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM, 75 nM, o 100 nM. La activación del receptor se puede medir por ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor, por ejemplo analizando células HEK293 co-transfectadas con ADN que codifica el receptor y un gen de luciferasa ligado al elemento sensible a AMPc como se describe en el Ejemplo 16.

**[0030]** En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón exhiben al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 5%, 10%, 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% o más actividad en el receptor de GIP en relación con GIP nativo (potencia de GIP). En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento no exhiben más de 1000%, 10000%, 100000%, o 1000000% de actividad en el receptor de GIP en relación con GIP nativo. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón exhiben al menos aproximadamente 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200 %, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%, o 500% o más actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón nativo (potencia de glucagón). En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento no exhiben más de 1000%, 10000%, 100000%, o 1000000% de actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón nativo. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón exhiben al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30 %, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% o más de actividad en el receptor de GLP-1 con relación a GLP-1 nativo (potencia de GLP-1). En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón aquí descritos exhiben no más de 1000%, 10000%, 100000%, o 1000000% de actividad en el receptor GLP-1 en relación con el GLP-1 nativo. La actividad de un péptido de glucagón en un receptor con respecto a un ligando nativo del receptor se calcula como la relación inversa de EE50 para el péptido de glucagón vs. el ligando nativo.

**[0031]** Por lo tanto, un aspecto de la invención proporciona péptidos de glucagón que muestran actividad tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GIP ("coagonistas de glucagón/GIP"). Estos péptidos de glucagón han perdido la selectividad del glucagón nativo para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GIP. En algunas realizaciones, la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su EC50 en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido de glucagón es inferior a aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia glucagón. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de GIP dividida por la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de glucagón es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 en el receptor de GIP dividida por la EC50 en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP del péptido de glucagón en comparación con la potencia de glucagón del péptido de glucagón es menor que aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GIP dividida por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la actividad de GLP-1 se ha reducido o destruido significativamente, por ejemplo, por una modificación de aminoácidos en la posición 7, una delección del aminoácido o aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28, produciendo un péptido de 27 o 28 aminoácidos, o una combinación de los mismos.

**[0032]** Otro aspecto de la invención proporciona péptidos de glucagón que muestran actividad en los receptores de glucagón, GIP y GLP-1 ("triagonistas de glucagón/GIP/GLP-1"). Estos péptidos de glucagón han perdido la selectividad de glucagón nativo para el receptor de glucagón en comparación con los receptores de GLP-1 y GIP. En algunas realizaciones, la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de sus respectivos EC50 en los receptores de glucagón y GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido de glucagón es inferior a

aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de glucagón y GLP-1. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 del triagonista en el receptor de GIP dividida por la EC50 del triagonista en el receptor de GLP-1 es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 en el receptor de GIP dividida por la EC50 en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia GIP del triagonista en comparación con la potencia de GLP-1 del triagonista es menor de aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GIP dividida por la potencia en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En realizaciones relacionadas, la relación de la EC50 del triagonista en el receptor de GIP dividida por la EC50 del triagonista en el receptor de glucagón es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 en el receptor de GIP dividida por la EC50 en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP del triagonista en comparación con la potencia de glucagón del triagonista es menor de aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GIP dividida por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la EC50 del triagonista en el receptor de GLP-1 dividida por la EC50 del triagonista en el receptor de glucagón es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 en el receptor de GLP-1 dividida por la EC50 en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 del triagonista en comparación con la potencia de glucagón del triagonista es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GLP-1 dividido por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2).

**[0033]** Otro aspecto de la invención proporciona péptidos de glucagón que muestran actividad en los receptores de GLP-1 y GIP, pero en que la actividad de glucagón se ha reducido o destruido significativamente ("coagonistas de GIP/GLP-1"), por ejemplo, por una modificación de aminoácidos en la posición 3. Por ejemplo, la sustitución en esta posición por un aminoácido ácido, básico, o hidrófobo (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reduce la actividad de glucagón. En algunas realizaciones, la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su EC50 en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido de glucagón es menor que aproximadamente 25, 20, 15, 10, o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de GLP-1. En algunas realizaciones, estos péptidos de glucagón tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o más de aproximadamente 0,1% pero menos de aproximadamente 10%. En algunas realizaciones, la relación de la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de GIP dividida por la EC50 del péptido de glucagón en el receptor de GLP-1 es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5, y no menos de 1. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP del péptido de glucagón en comparación con la potencia de GLP-1 del péptido de glucagón es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5, y no menos de 1.

**[0034]** Un aspecto adicional de la invención proporciona péptidos de glucagón que muestran actividad en el receptor de GIP, en que la actividad de glucagón y GLP-1 se ha reducido o destruido significativamente ("péptidos de glucagón agonistas de GIP"), por ejemplo, mediante modificaciones de aminoácidos en las posiciones 3 y 7. En algunas realizaciones, estos péptidos de glucagón tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o más de aproximadamente 0,1%, 0,5%, o 1% pero menos de aproximadamente 1%, 5%, o 10%. En algunas realizaciones, estos péptidos de glucagón también tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, por ejemplo aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o más de aproximadamente 0,1%, 0,5 %, o 1% pero menos de aproximadamente 1%, 5%, o 10%.

**[0035]** Según algunas realizaciones de la invención, el análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP comprende la SEQ ID NO: 1 con (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, (b) una modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa de la parte C-terminal (aminoácidos 12-29) del análogo, y (c) opcionalmente, de 1 a 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) modificaciones adicionales de aminoácidos. En algunas realizaciones, el análogo muestra al menos aproximadamente 1% de actividad de GIP nativo en el receptor de GIP o cualquier otro nivel de actividad en el receptor de GIP descrito en este documento. La modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa puede ser cualquiera de las conocidas en la técnica, tales como, por ejemplo, cualquiera de las descritas en este documento. Véanse las enseñanzas en la sección "La estabilización de la estructura de hélice alfa." En algunas realizaciones, la modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa es una modificación seleccionada del grupo que consiste en: (i) un puente de lactama entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las cadenas

laterales de aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , en el que  $i$  es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que  $j$  es 17, y (ii) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21, y 24 del análogo están sustituidos por un aminoácido alfa,alfa-disustituido. Tales análogos de glucagón que tienen actividad agonista de GIP se describen adicionalmente en este documento.

5 **[0036]** En algunas realizaciones, se proporciona en este documento un análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP, con las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácido en la posición 1,

10 (b) (i) un puente de lactama entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , en el que  $i$  es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que  $j$  es 17, o (ii) una sustitución de aminoácido por un aminoácido alfa,alfa-disustituido en uno, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21, o 24,

(c) modificaciones de aminoácidos en uno, dos o todos de las posiciones 27, 28 y 29, y

15 (d) 1, 2, 3, 4, 5, 6, y 8 modificaciones adicionales de aminoácidos,

en el que la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 100 nM o menos.

**[0037]** En realizaciones de ejemplo,

20 (a) la modificación de aminoácidos en la posición 1 es una sustitución de His en la posición 1 por un aminoácido aromático grande, opcionalmente Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, cloro-Phe, sulfato-Phe, 4-piridil-Ala, metil-Tyr, o 3-amino Tyr,

(b) (i) el puente de lactama está entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, en el que uno de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido por Glu, y el otro de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido por Lys, o (ii) el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB,

25 (c) la Met en la posición 27 está sustituida por un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu,

(d) la Asn en la posición 28 está sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y

(e) la Thr en la posición 29 está sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Gly.

**[0038]** El análogo puede comprender modificaciones adicionales, incluyendo sin limitación:

30 (a) modificación de aminoácidos en la posición 12, opcionalmente la sustitución por Ile,

(b) modificaciones de aminoácidos en las posiciones 17 y 18, opcionalmente la sustitución por Q en la posición 17 y A en la posición 18,

(c) la adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) al extremo C-terminal, o cualquier combinación de los mismos.

35 **[0039]** El análogo puede alternativamente o adicionalmente comprender otras modificaciones, incluyendo sin limitación:

(a) Ser en la posición 2 sustituida por D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val, o ácido alfa-amino-N-butírico;

(b) Tyr en la posición 10 sustituida por Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;

(c) unión de un grupo acilo a una Lys en la posición 10;

(d) Lys en la posición 12 sustituido por Arg;

40 (e) Ser en la posición 16 sustituido por Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o AIB;

(f) Arg en la posición 17 sustituido por Gln, Lys o Glu;

(g) Arg en la posición 18 sustituido por Ala, Ser, Thr, o Gly;

(h) Gln en la posición 20 sustituido por Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o AIB;

45 (i) Asp en la posición 21 sustituido por Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;

(j) Val en la posición 23 sustituido por Ile;

(k) Gln en la posición 24 sustituido por Asn, Ala, Ser, Thr, Glu, Lys, o Aib; y

(l) una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, y 29,

o cualquier combinación de los mismos.

50 **[0040]** En algunas realizaciones, cuando el péptido de glucagón no está pegilado, la EC50 del análogo para la

activación del receptor de GIP es de aproximadamente 4, 2, 1 nM o menos, o el análogo tiene al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de la actividad de GIP nativo en el receptor de GIP. En realizaciones

55 relacionadas, la EC50 del análogo no pegilado para la activación del receptor de GLP-1 es de aproximadamente 4, 2, 1 nM o menos o tiene al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de la actividad de GLP-1 nativo en el

receptor de GLP-1. En aún otras realizaciones relacionadas, la EC50 del análogo no pegilado para la activación del receptor de glucagón es de aproximadamente 4, 2, 1 nM o menos, o al menos aproximadamente 5%, 10%, 15% o

20% de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el análogo no pegilado tiene menos de aproximadamente 1% de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón. En

60 otras realizaciones, el análogo no pegilado tiene menos de aproximadamente 10%, 5% o 1% de la actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

65 **[0041]** En algunas realizaciones, el péptido de glucagón se une covalentemente a un grupo hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, o 29, después de la posición 29 en un aminoácido añadido (por ejemplo, la posición 30) dentro de una extensión C-terminal, o en el aminoácido C-terminal. En realizaciones de ejemplo, este grupo hidrófilo está unido covalentemente a un residuo de Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil



fenilalanina en cualquiera de estas posiciones. Los restos hidrófilos de ejemplo incluyen polietilenglicol (PEG), por ejemplo, de un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, o de aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

5 **[0042]** En dichas realizaciones en las que los análogos están unidos a restos hidrófilos, tales como PEG, las EC50  
relativas en uno o más receptores puede ser mayor, por ejemplo, aproximadamente 10 veces mayor, en  
comparación con el análogo que carece del grupo hidrófilo. Por ejemplo, la EC50 de un análogo pegilado para la  
10 activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos, o el análogo tiene al menos  
aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, o 0,5% de la actividad de GIP nativo en el receptor de GIP. En  
realizaciones relacionadas, la EC50 de un análogo pegilado para la activación del receptor de GLP-1 es de  
aproximadamente 10 nM o menos o tiene al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5% de la  
15 actividad de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1. En aún otras realizaciones relacionadas, la EC50 de un análogo  
pegilado para la activación del receptor de glucagón es de aproximadamente 10 nM o menos, o al menos  
aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5% o 2% de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón. En algunas  
realizaciones, el análogo tiene menos de aproximadamente 1% de la actividad de glucagón natural en el receptor de  
glucagón. En otras realizaciones, el análogo tiene menos de aproximadamente 10%, 5% o 1% de la actividad de  
GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

20 **[0043]** El péptido de glucagón puede ser parte de un dímero, trímero o multímero de orden más alto que comprende  
al menos dos, tres, o más péptidos unidos a través de un enlazador, en el que al menos uno o ambos péptidos es un  
péptido de glucagón. El dímero puede ser un homodímero o heterodímero. En algunas realizaciones, el enlazador se  
selecciona del grupo que consiste en un agente de reticulación de tiol bifuncional y un agente de reticulación de  
amina bifuncional. En ciertas realizaciones, el enlazador es PEG, por ejemplo, un PEG 5 kDa, un PEG de 20 kDa.  
25 En algunas realizaciones, el enlazador es un enlace disulfuro. Por ejemplo, cada monómero del dímero puede  
comprender un residuo de Cys (por ejemplo, una Cys situada terminalmente o internamente) y el átomo de azufre de  
cada residuo Cys participa en la formación del enlace disulfuro. En algunos aspectos de la invención, los  
monómeros están conectados a través aminoácidos terminales (por ejemplo, N-terminal o C-terminal), a través de  
aminoácidos internos, o por medio de un aminoácido terminal del al menos un monómero y un aminoácido interno  
30 de por lo menos otro monómero. En aspectos específicos, los monómeros no están conectados a través de un  
aminoácido N-terminal. En algunos aspectos, los monómeros del multímero están unidos entre sí en una orientación  
"cola con cola" en la que los aminoácidos C-terminales de cada monómero están unidos juntos. Se puede unir  
covalentemente un resto conjugado a cualquiera de los péptidos de glucagón descritos en este documento,  
incluyendo un dímero, trímero o multímero de orden superior.

35 **[0044]** Cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento que aumentan la actividad del receptor  
de glucagón, retienen la actividad parcial del receptor de glucagón, mejoran la solubilidad, aumentan la estabilidad, o  
reducen la degradación se puede aplicar a los péptidos de glucagón individualmente o en combinación. En algunas  
realizaciones, los péptidos de glucagón son solubles a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8,  
o entre 6 y 9, o entre 7 y 9 (por ejemplo, pH 7), y opcionalmente retienen al menos 95% del péptido original (por  
40 ejemplo 5% o menos del péptido original se degrada o escinde) después de 24 horas a 25°C.

**[0045]** Se proporcionan composiciones farmacéuticas estériles que comprenden un vehículo o diluyente  
farmacéuticamente aceptable y kits que comprenden los dispositivos. Se proporcionan métodos para reducir el  
45 aumento de peso o inducir la pérdida de peso, que comprenden administrar a un paciente en necesidad del mismo  
tales composiciones farmacéuticas en una cantidad efectiva para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de  
peso. Se proporcionan métodos de tratamiento de la diabetes, que comprenden administrar a un paciente en  
necesidad del mismo tales composiciones farmacéuticas en una cantidad efectiva para reducir los niveles de  
glucosa en sangre.

50 **[0046]** Todos los métodos terapéuticos, composiciones farmacéuticas, kits y otras realizaciones similares descritas  
en este documento contemplan que el uso de los términos péptidos, agonistas, agonistas, coagonistas, triagonistas  
o análogos incluyen sales o ésteres farmacéuticamente aceptables de los mismos.

**[0047]** El resumen anterior no pretende definir cada aspecto de la invención, y las realizaciones adicionales se  
55 describen en otras secciones, tales como la descripción detallada. Todo el documento está destinado a ser  
relacionado como una divulgación unificada, y se debe entender que todas las posibles combinaciones de  
características descritas en este documento pueden ser contempladas, aún cuando la combinación de  
características no se encuentren juntas en la misma frase o párrafo, o sección de este documento.

60 **[0048]** Además, la invención incluye cualquiera o todas las realizaciones de la invención que son más limitadas en  
su alcance de cualquier manera que las variaciones definidas en los párrafos específicos de este documento. Por  
ejemplo, cuando se describen ciertos aspectos de la invención, tal como un término genérico, debe entenderse que  
cada miembro de este término genérico es, individualmente, una realización de la invención, y que las  
combinaciones de dos o más miembros del término genérico son realizaciones de la invención.

65

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0049]**

La Figura 1 representa un gráfico del % de cambio en el peso corporal en ratones en función del tiempo (días) después de la administración de vehículo solo (triángulos invertidos no rellenos), quimera 2 AIB2 Cys24 (40K PEG) (cuadrados rellenos), antagonista de GIP Pro3 Cys24 GIP-NH<sub>2</sub> (1-42) 40K PEG (diamantes no rellenos), agonista de GIP AIB2 Cys24 GIP (1-42) 40K PEG (triángulos verticales no rellenos con línea de puntos), o una hormona peptídica no relacionada (triángulos invertidos sombreados).

La Figura 2 representa un gráfico de la ingesta de alimentos (en gramos) por los ratones en función del tiempo después de la administración de vehículo solo (triángulos invertidos no rellenos), quimera 2 AIB2 Cys24 (40K PEG) (cuadrados rellenos), antagonista de GIP Pro3 Cys24 GIP-NH<sub>2</sub> (1-42) 40K PEG (diamantes no rellenos), agonista de GIP AIB2 Cys24 GIP (1-42) 40K PEG (triángulos verticales no rellenos con línea de puntos), o una hormona peptídica no relacionada (triángulos invertidos sombreados).

La figura 3 representa un gráfico del cambio en los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) en ratones en el día 7 después de la administración de vehículo solo (barra negra), quimera 2 AIB2 Cys24 (40K PEG) (barra blanca), antagonista de GIP Pro3 Cys24 GIP-NH<sub>2</sub> (1-42) 40K PEG (barra sombreada), agonista de GIP AIB2 Cys24 GIP (1-42) 40K PEG (barra en líneas horizontales), o una hormona peptídica no relacionada (barra en líneas verticales).

La Figura 4 representa un gráfico del % de cambio en el peso corporal en ratones en función del tiempo (días) después de la administración de vehículo solo (triángulos invertidos rellenos), quimera 2 AIB2 (rombos no rellenos), quimera 2 AIB2 lactama (triángulos no rellenos), péptido triagonista mt-170 (cuadrados no rellenos), péptido coagonista de GIP/glucagón mt-182 (rombos rellenos), péptido coagonista de GLP-1/GIP mt-178 (triángulos sombreados con línea de puntos), o péptido coagonista de GIP/glucagón mt-179 (cuadrados rellenos). Debe tenerse en cuenta que el mt-179 PEGilado actúa como un triagonista.

La Figura 5 es un gráfico del % de cambio en el peso corporal en ratones en función del tiempo (días) después de la administración de vehículo solo (triángulos verticales rellenos), agonista de GLP-1 E 16 a 10 nmol/kg (triángulos invertidos rellenos) o 35 nmol/kg (cuadrados no rellenos), péptido triagonista mt-170 a 10 nmol/kg (triángulos invertidos no rellenos), o 35 nmol/kg (rombos rellenos), o péptido coagonista de GLP-1/GIP mt-178 a 10 nmol/kg (triángulos invertidos grises) o a 35 nmol/kg (cuadrados grises).

La Figura 6 es un gráfico del cambio en los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) en ratones en el día 7 después de la administración de vehículo solo (barra de color negro), agonista de GLP-1 E 16 a 10 nmol/kg (barra blanca) o 35 nmol/kg (barra gris), péptido triagonista mt-170 a 10 nmol/kg (barra horizontal con líneas) o 35 nmol/kg (barra vertical con líneas) o péptido coagonista de GLP-1/GIP mt-178 a 10 nmol/kg (barra con líneas diagonales derecha-izquierda) o 35 nmol/kg (barra con líneas diagonales izquierda-derecha).

La Figura 7 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) en función del tiempo antes y después de una inyección de glucosa (administrado en punto de tiempo 0) de los ratones inyectados (en punto de tiempo -60) con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, un análogo de glucagón activo de GIP que contiene lactama (cíclico), pegilado ("mt-178"), o un análogo de glucagón activo de GIP que carece de lactama (lineal), pegilado ("mt-274"), a 1, 3, o 10 nmol/kg/semana. Los datos de esta figura no incluyen los datos de cuatro ratones, ya que estos ratones mostraron un comportamiento agresivo y pérdida de peso sustancial.

La Figura 8 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) en función del tiempo antes y después de una inyección de glucosa (administrado en punto de tiempo 0) de ratones inyectados (24 horas antes de la inyección de glucosa) con un control del vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, o mt-274 a 1, 3, o 10 nmol/kg/semana. Los datos de esta figura no incluyen los datos de cuatro ratones, ya que estos ratones mostraron un comportamiento agresivo y pérdida de peso sustancial.

La Figura 9 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones 0 o 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, o mt-274 a 1, 3, o 10 nmol/kg/semana. Los datos de esta figura no incluyen los datos de cuatro ratones, ya que estos ratones mostraron un comportamiento agresivo y pérdida de peso sustancial.

La Figura 10 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de ratones 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, o mt-274 a 1, 3, o 10 nmol/kg/semana. Los datos de esta figura no incluyen los datos de cuatro ratones, ya que estos ratones mostraron un comportamiento agresivo y pérdida de peso sustancial.

La Figura 11 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones 0 ó 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, mt-178 (TE), mt-274 o mt-274 (TE) a 10 o 35 nmol/kg/semana. "TE" indica un grupo PEG unido a la Cys en la posición 40.

La Figura 12 representa un gráfico del cambio de glucosa en sangre (mg/dL) de ratones 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, mt-178 (TE), mt-274, o mt-274 (TE) a 10 o 35 nmol/kg/semana. "TE" indica un grupo PEG unido a la Cys en la posición 40.

La Figura 13 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de ratones 0, 1, 3, 5, 7, y 10 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, mt-178 (TE), mt-274, o mt-274 (TE) a 10 o 35 nmol/kg/semana. "TE" indica un grupo PEG unido a la Cys en la posición 40.

La Figura 14 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de ratones 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, mt-178 (TE), mt-274, o mt-274 (TE) a 10 o 35 nmol/kg/semana. "TE" indica un grupo PEG unido a la Cys en la posición 40.

La Figura 15 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones 0 o 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, mt-274, un péptido lineal, no pegilado, no acilado ("mt-311"), un péptido graso C14 acilado lineal ("mt-309"), un péptido graso C16 acilado lineal ("mt-298"), o un péptido graso C18 acilado lineal ("mt-310") a 10 nmol/kg.

La Figura 16 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de ratones 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de péptido agonista de GLP-1, mt-178, mt-274, mt-311, mt-309, mt-298, o mt-310 a 10 nmol/kg.

La Figura 17 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de los ratones 7 días después de la inyección con un control de vehículo, un control de GLP-1 agonista de péptido, mt-178, mt-274, mt-311, mt-309, mt-298 o mt-310 a 10 nmol/kg.

La Figura 18 representa un gráfico del cambio de los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de los ratones 0 y 7 días después de las inyecciones QD durante 7 días con un control del vehículo, liraglutide (un análogo de GLP-1 acilado), un péptido graso C14 acilado no pegilado lineal ("mt-260"), un péptido graso C16 acilado no pegilado lineal ("mt-261"), o un péptido graso C18 acilado no pegilado lineal ("mt-262") a 25 o 125 nmol/kg.

La Figura 19 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de ratones 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la inyección con un control del vehículo, liraglutide, mt-260, mt-261, o mt-262 a 25 o 125 nmol/kg.

La Figura 20 representa un gráfico del porcentaje de cambio en el peso corporal de ratones 7 días después de la inyección con un control del vehículo, liraglutide, mt-260, mt-261, o mt-262 a 25 o 125 nmol/kg.

La Figura 21 representa un gráfico del cambio en el peso corporal (g) de los ratones 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la primera inyección con un control del vehículo, liraglutide (30 nmol/kg/día), o mt-261 (0,3, 1, 3, 10, o 30 nmol/kg/día).

La Figura 22 representa un gráfico de la masa grasa de los ratones 7 días después de la primera inyección con un control del vehículo, liraglutide (30 nmol/kg/día), o mt-261 (0,3, 1, 3, 10, o 30 nmol/kg/día).

La Figura 23 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones 0 y 7 días después de la primera inyección con un control del vehículo, liraglutide (30 nmol/kg/día), o mt-261 (0,3, 1, 3, 10, o 30 nmol/kg/día).

La Figura 24 representa un gráfico de líneas del cambio en el peso corporal (% de cambio) en función del tiempo de los ratones inyectados con mt-263, exendina-4, o un control de vehículo a las dosis (nmol/kg/día) indicadas en ().

La Figura 25 representa un gráfico de barras del cambio total en el peso corporal (%) (medido en el día 7, en comparación con el día 0) de los ratones inyectados con mt-263, exendina-4, o un control de vehículo a las dosis (nmol/kg/día) indicadas en ().

La Figura 26 representa un gráfico de barras del cambio en los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) (medidos en el día 7, en comparación con el día 0) de los ratones inyectados con mt-263, exendina-4, o un control de vehículo a las dosis (nmol/kg/día) indicadas en ().

La Figura 27 representa un gráfico del % de cambio en el peso corporal de los ratones 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la primera inyección con un control del vehículo, liraglutide, mt-277, mt-278, o mt-279.

La Figura 28 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones 0 y 7 días después de la primera inyección con un control del vehículo, liraglutide, mt-277, mt-278, o mt-279.

La Figura 29 representa un gráfico del cambio total en el peso corporal (%) de los ratones medido 7 días después de la administración de mt-331, mt-311, o un control de vehículo. Las dosis (nmol/kg) se indican en ().

La Figura 30 representa un gráfico de la ingesta total de alimentos (g) por los ratones medida 7 días después de la administración de mt-331, mt-311, o un control de vehículo. Las dosis (nmol/kg) se indican en ().

La Figura 31 representa un gráfico de la variación total en los niveles de glucosa en sangre de ratones medida 7 días después de la administración de mt-331, mt-311, o un control de vehículo. Las dosis (nmol/kg) se indican en ().

La Figura 32 representa un gráfico del cambio total en el peso corporal de los ratones medido 7 días después de la administración de mt-331, mt-353, o un control de vehículo a la dosis indicada (nmol/kg) mostrada en ().

La Figura 33 representa un gráfico de la ingesta total de alimentos (g) por los ratones medida 7 días después de la administración de mt-331, mt-353, o un control de vehículo a la dosis indicada (nmol/kg) mostrada en ().

La Figura 34 representa un gráfico de la variación de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones medida 7 días después de la administración de mt-331, mt-353, o un control de vehículo a la dosis indicada (nmol/kg) mostrada en ().

La Figura 35 representa un gráfico del cambio total en el peso corporal (%) de los ratones medido 7 días después de la primera administración de mt-277, mt-278, mt-279, o un control de vehículo.

La Figura 36 representa un gráfico del cambio total en el peso corporal (%) de los ratones medido 6 días después de la primera administración de mt-261, mt-309, o un control de vehículo.

La Figura 37 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de ratones medidos 6 días después de la primera administración de mt-261, mt-309, o un control de vehículo. La primera barra de cada par de barras del mismo patrón es los niveles de glucosa en la sangre medidos en el día 0 y la segunda barra de cada par es el nivel en el día 6.

La Figura 38 representa un gráfico de barras del cambio total en el peso corporal (%) medido 6 días después de la primera administración de mt-261 (en comparación con el peso corporal medido en el primer día de administración) de los ratones inyectados con un control de vehículo o mt-261 tal como se describe adicionalmente en este documento.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

**[0050]** La presente invención se refiere a un análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP con las modificaciones tal como se describe en las reivindicaciones. Estas modificaciones descritas en las reivindicaciones se detallan adicionalmente a continuación.

**[0051]** La presente invención también se refiere al péptido tal como se define en las reivindicaciones 12 a 17.

**[0052]** La presente invención también se refiere a un conjugado, dímero o péptido de fusión que comprende un análogo o péptido tal como se define en las reivindicaciones.

5 **[0053]** La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el análogo tal como se define en las reivindicaciones, el péptido tal como se define en las reivindicaciones, el conjugado, dímero o péptido de fusión tal como se define en las reivindicaciones, o una combinación de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **[0054]** La presente invención también se refiere a un kit que comprende una composición farmacéutica tal como se define en las reivindicaciones y un dispositivo para administrar dicha composición farmacéutica a un paciente, opcionalmente en el que el dispositivo comprende una jeringa que comprende la composición farmacéutica.

15 **[0055]** La presente invención también se refiere a un análogo tal como se define en las reivindicaciones o el péptido tal como se define en las reivindicaciones para usar en la reducción del aumento de peso o la inducción de la pérdida de peso o el tratamiento de la diabetes.

20 **[0056]** La presente invención también se refiere al uso de un análogo tal como se define en las reivindicaciones o el péptido tal como se define en las reivindicaciones en la preparación de un medicamento para la reducción del aumento de peso o la inducción de la pérdida de peso o el tratamiento de la diabetes.

#### DEFINICIONES

25 **[0057]** Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones establecidas a continuación.

30 **[0058]** El término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, 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.

35 **[0059]** Tal como se utiliza en el presente documento, 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.

40 **[0060]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de compuestos que retienen la actividad biológica del compuesto parental, y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Muchos de los compuestos descritos en este documento son capaces de formar sales ácidas y/o básicas debido a la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

45 **[0061]** 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.

50 **[0062]** 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.

55 **[0063]** Tal como se utiliza en el presente documento, 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 en el presente documento, el término "tratamiento de la diabetes" se referirá en general a la alteración de los niveles de glucosa en sangre en la dirección de los niveles normales y puede incluir aumentar o disminuir los niveles de glucosa en sangre dependiendo de una situación determinada.

65 **[0064]** Tal como se utiliza en el presente documento, una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido 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 hipoglucemia, tal como se mide, por ejemplo, por un aumento en el nivel de glucosa en sangre. Un efecto deseado alternativo para los péptidos de glucagón de la presente descripción incluiría el tratamiento de la hiperglucemia, por ejemplo, medida por un cambio

en el nivel de glucosa en sangre cerca de lo normal, o la inducción de la pérdida de peso/prevenición del aumento de peso, por ejemplo, medidos por la reducción en el peso corporal o prevenir o reducir un aumento en el peso corporal, o normalización de la distribución de grasa corporal. 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 ser determinada por un experto normal en la técnica usando experimentación de rutina.

**[0065]** El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra ruta, tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

**[0066]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" y términos similares se refieren al aislamiento de una molécula o compuesto en una forma que está sustancialmente libre de contaminantes normalmente asociados con la molécula o compuesto en un medio nativo o natural. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa. El término "polipéptido purificado" se utiliza aquí para describir un polipéptido que se ha separado de otros compuestos incluyendo, pero no limitado a, moléculas de ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono.

**[0067]** El término "aislado" requiere que el material de referencia se extraiga de su medio original (por ejemplo, el medio natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido de origen natural presente en un animal vivo no se aísla, pero el mismo polinucleótido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado.

**[0068]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" abarca una secuencia de 3 o más aminoácidos y típicamente menos de 50 aminoácidos, en el que los aminoácidos son aminoácidos de origen natural o no natural. Los aminoácidos 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.

**[0069]** Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "polipéptido" y "proteína" son términos que se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de aminoácidos, sin tener en cuenta la longitud del polímero. Típicamente, polipéptidos y las proteínas tienen una longitud de polímero que es mayor que la de "péptidos".

**[0070]** Un "péptido de glucagón" tal como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier péptido que comprende, ya sea la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o cualquier análogo de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, incluyendo sustituciones, adiciones, deleciones o modificaciones después de la traducción de aminoácidos (por ejemplo, metilación, acilación, alquilación, ubiquitinación, enlace covalente intramolecular, tal como la formación de puente de lactama, PEGilación, y similares) del péptido, donde el análogo estimula la actividad del receptor de glucagón o GLP-1 o GIP, por ejemplo, medida por la producción de AMPc utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 16.

**[0071]** El término "agonista de glucagón" se refiere a un complejo que comprende un péptido de glucagón que estimula la actividad del receptor de glucagón, por ejemplo, medida por la producción de AMPc utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 16.

**[0072]** Tal como se utiliza en el presente documento una "modificación" de aminoácido se refiere a una sustitución, adición o deleción de un aminoácido, e incluye la sustitución con o adición de cualquiera de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o no naturales. A lo largo de la solicitud, todas las referencias a una posición de aminoácido particular por número (por ejemplo, posición 28) se refieren al aminoácido en esa posición en el glucagón nativo (SEQ ID NO: 1) o la posición de aminoácido correspondiente en cualquiera de los análogos del mismo. Por ejemplo, una referencia en este documento a "posición 28" significaría la posición correspondiente 27 para un análogo de glucagón en la que el primer aminoácido de SEQ ID NO: 1 ha sido eliminado. Del mismo modo, una referencia en este documento a "posición 28" significaría la posición correspondiente 29 para un análogo de glucagón en el cual un aminoácido ha sido añadido antes del extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1. 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 comprar de proveedores comerciales, sintetizarse de novo, o modificarse o derivarse químicamente de otros aminoácidos.

**[0073]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucagón nativo" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1, el término "GIP nativo" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 4, y el término "GLP-1 nativo" es un término genérico que designa GLP-1 (7-36) amida (que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 3), GLP-1 (7-37) ácido (que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2) o una mezcla de estos dos compuestos. Como se utiliza en este documento, una referencia general a "glucagón" o "GIP" o "GLP-1" en ausencia de cualquier designación adicional pretende significar el glucagón nativo o GIP nativo o GLP-1 nativo, respectivamente.

[0074] Tal como se utiliza en el presente documento, una "sustitución" de aminoácido se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente.

[0075] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución conservativa de aminoácidos" se define aquí como los intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

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

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas:

Asp, Asn, Glu, Gln;

III. Residuos polares cargados positivamente:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Residuos alifáticos grandes, no polares:

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

V. Residuos aromáticos grandes:

Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

[0076] Tal como se utiliza en el presente documento, 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 utiliza 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.

[0077] Tal como se utiliza en el presente documento, 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.

[0078] Tal como se utiliza en el presente documento, 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.

[0079] Tal como se utiliza en el presente documento, un "enlazador" es un enlace, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los enlazadores pueden proporcionar 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.

[0080] Tal como se utiliza en el presente documento, 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.

[0081] Tal como se utiliza en el presente documento, 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.

[0082] Tal como se utiliza en el presente documento, 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.

[0083] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "selectividad" de una molécula por un primer receptor con relación a un segundo receptor se refiere a la siguiente relación:  $EC_{50}$  de la molécula en el segundo receptor dividido por la  $EC_{50}$  de la molécula en el primer receptor. Por ejemplo, una molécula que tiene una  $EC_{50}$  de 1 nM en un primer receptor y una  $EC_{50}$  de 100 nM en un segundo receptor tiene selectividad 100 veces para el primer receptor en relación con el segundo receptor.

[0084] Tal como se utiliza en el presente documento, la "potencia glucagón" de una molécula se refiere a la relación de la  $EC_{50}$  de la molécula en receptor de glucagón dividida por la  $EC_{50}$  de glucagón nativo en receptor de

glucagón.

[0085] Tal como se utiliza en el presente documento, "potencia de GIP" de una molécula se refiere a la relación de la EC50 de la molécula en el receptor de GIP dividida por la EC50 de GIP nativo en receptor de GIP.

[0086] Tal como se utiliza en el presente documento, "potencia de GLP-1" de una molécula se refiere a la relación de la EC50 de la molécula en el receptor de GLP-1 dividido por la EC50 de GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

[0087] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene el número indicado de átomos de carbono. Alquilos de ejemplo se incluyen metilo, etilo, y grupos propilo lineales.

[0088] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroalquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo en el esqueleto de la estructura. Los heteroátomos adecuados para los propósitos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, N, S, y O.

[0089] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cicloalquilo" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico que contiene el número indicado de átomos de carbono, por ejemplo, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclohexilo, y ciclopentilo.

[0090] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heterocíclico" se refiere a un grupo hidrocarburo cíclico que contiene el número indicado de átomos de carbono y de uno a tres heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. Los ejemplos no limitantes de grupos heterocicloalquilo incluyen piperidina, tetrahidrofurano, tetrahidropirano, dihidrofurano, morfolina, tiofeno, y similares.

[0091] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico o policíclico, preferiblemente un grupo aromático monocíclico o bicíclico, por ejemplo, fenilo o naftilo, que contiene el número indicado de átomos de carbono. A menos que se indique lo contrario, un grupo arilo puede estar no sustituido o sustituido.

[0092] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un grupo aromático monocíclico o policíclico que contiene el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en oxígeno, nitrógeno y azufre. A menos que se indique lo contrario, un grupo arilo puede estar no sustituido o sustituido.

## REALIZACIONES

[0093] Las modificaciones descritas en este documento permiten la manipulación de glucagón (SEQ ID NO: 1) para crear péptidos de glucagón presentan una mayor actividad que GIP, mayor actividad de glucagón, y/o mayor actividad de GLP-1. Otras modificaciones descritas en este documento prolongan la vida media, aumentan la solubilidad, o aumentan la estabilidad del péptido resultante. Sin embargo, otras modificaciones descritas en este documento no tienen ningún efecto sobre la actividad, o pueden hacerse sin destruir la actividad o actividades deseadas. Cualquiera de las combinaciones que tengan el mismo propósito (por ejemplo, aumento de la actividad de GIP) puede aplicarse individualmente o en combinación. Cualquiera de los elementos individuales o conjuntos de combinaciones que confieren propiedades mejoradas pueden aplicarse individualmente o en combinación, por ejemplo, mayor actividad de GIP y/o GLP-1 se puede combinar con una mayor vida media.

[0094] En realizaciones de ejemplo, el péptido de glucagón puede comprender un total de 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de glucagón nativo. En algunas realizaciones, tales péptidos de glucagón retienen al menos 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de los aminoácidos de origen natural en las posiciones correspondientes en el glucagón nativo (por ejemplo, tienen 1-7 1-5 ó 1-3 modificaciones relativas al glucagón de origen natural). En realizaciones relacionadas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las modificaciones de aminoácidos pueden ser sustituciones no conservativas, adiciones o deleciones. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las modificaciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas. En algunas realizaciones 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones no conservativas se llevan a cabo en cualquiera de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 y hasta 5 sustituciones conservativas adicionales se llevan a cabo en cualquiera de estas posiciones. En algunas realizaciones 1, 2, o 3 modificaciones de aminoácidos se llevan a cabo dentro de los aminoácidos en las posiciones 1-16, y 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos se llevan a cabo dentro de los aminoácidos en las posiciones 17-26.

### *Modificaciones que afectan a la actividad de GIP*

[0095] Una mayor actividad en el receptor de GIP es proporcionada por una modificación de aminoácidos en la posición 1. Por ejemplo, His en la posición 1 es sustituida por un aminoácido aromático grande, opcionalmente Tyr,

Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, cloro-Phe, sulfo-Phe, 4-piridil-Ala, metil-Tyr, o 3-amino Tyr. Inesperadamente, la combinación de Tyr en la posición 1 con la estabilización de la hélice alfa en la región correspondiente a los aminoácidos 12-29 proporcionó un péptido de glucagón que activa el receptor de GIP, así como el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón. La estructura de hélice alfa puede estabilizarse mediante, por ejemplo, la formación de un puente intramolecular covalente o no covalente, o la sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12 a 29 con un aminoácido estabilizador de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido alfa, alfa-disustituido).

**[0096]** Una mayor actividad en el receptor de GIP también es proporcionada por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 27 y/o 28, y opcionalmente en la posición 29. Por ejemplo, la Met en la posición 27 es sustituida por un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, la Asn en la posición 28 es sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y la Thr en la posición 29 es sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Gly. La sustitución con LAG en las posiciones 27-29 proporciona una mayor actividad de GIP en relativa a la secuencia de MNT nativa en esas posiciones.

**[0097]** Una mayor actividad en el receptor de GIP también es proporcionada por una modificación de aminoácidos en la posición 12. Por ejemplo, la posición 12 es sustituida por un aminoácido alifático grande no polar, opcionalmente Ile.

**[0098]** Una mayor actividad en el receptor de GIP también es proporcionada por una modificación de aminoácidos en las posiciones 17 y/o 18. Por ejemplo, la posición 17 es sustituida por un residuo polar, opcionalmente Gln, y la posición 18 es sustituida por un amino alifático ácido pequeño, opcionalmente Ala. Una sustitución por QA en las posiciones 17 y 18 proporciona una mayor actividad de GIP relativa a la secuencia nativa RR en esas posiciones.

**[0099]** Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente que aumentan la actividad del receptor GIP puede aplicarse individualmente o en combinación. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor GIP generalmente proporcionan una mayor actividad de GIP que cualquiera de tales modificaciones tomadas por separado.

#### *Modificaciones que afectan a la actividad de glucagón*

**[0100]** En algunas realizaciones, se proporcionan análogos de glucagón que tienen una mayor potencia y, opcionalmente, una mejor solubilidad y estabilidad. En una realización, una mayor potencia de glucagón es proporcionada por una modificación de aminoácidos en la posición 16 de glucagón nativo (SEQ ID NO: 1). A modo de ejemplo no limitativo, dicha mayor potencia se puede proporcionar mediante la sustitución de la serina de origen natural en la posición 16 por ácido glutámico o por otro aminoácido cargado negativamente que tenga una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o como alternativa con una cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico, o un aminoácido cargado que tenga una cadena lateral que contenga al menos un heteroátomo, (por ejemplo, N, O, S, P) y con una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón conserva su selectividad original para el receptor de glucagón en relación a los receptores de GLP-1.

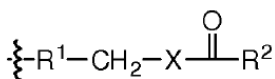
**[0101]** La actividad del receptor de glucagón se puede reducir por una modificación de aminoácidos en la posición 3, por ejemplo, sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 3, por un aminoácido ácido, básico, o hidrófobo. Por ejemplo, la sustitución en la posición 3 por ácido glutámico, ornitina, o norleucina reduce o destruye sustancialmente la actividad del receptor de glucagón.

**[0102]** Una actividad mantenida o mejorada en el receptor de glucagón puede conseguirse mediante la modificación de Gln en la posición 3 por un análogo de glutamina. Por ejemplo, un péptido de glucagón que comprende un análogo de glutamina en la posición 3 puede presentar aproximadamente 5%, aproximadamente el 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 50%, o aproximadamente 85% o mayor actividad del glucagón nativo (SEQ ID NO: 1) en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, un péptido de glucagón que comprende un análogo de glutamina en la posición 3 puede presentar aproximadamente el 20%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 100%, aproximadamente 200% o aproximadamente 500% o mayor actividad de un péptido de glucagón correspondiente que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido que comprende el análogo de glutamina, excepto el ácido amino modificado en la posición 3 (por ejemplo, SEQ ID NO: 250 o la SEQ ID NO: 251) en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, un péptido de glucagón que comprende un análogo de glutamina en la posición 3 presenta una actividad mejorada en el receptor de glucagón, pero la actividad mejorada no es más del 1000%, 10000%, 100000%, o 1000000% de la actividad del glucagón nativo o de un péptido de glucagón correspondiente que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido que comprende el análogo de glutamina, excepto por el aminoácido modificado en la posición 3.

**[0103]** En algunas realizaciones, el análogo de glutamina es un aminoácido de origen natural o no natural que comprende una cadena lateral de la Estructura I, II o III:

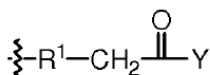


5



Estructura I

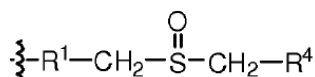
10



Estructura II

15

20



Estructura III

25

30

35

en la que R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>0-3</sub> o heteroalquilo C<sub>0-3</sub>; R<sup>2</sup> es NHR<sup>4</sup> o alquilo C<sub>1-3</sub>; R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>; R<sup>4</sup> es H o alquilo C<sub>1-3</sub>; X es NH, O, o S; e Y es NHR<sup>4</sup>, SR<sup>3</sup>, u OR<sup>3</sup>. En algunas realizaciones, X es NH o Y es NHR<sup>4</sup>. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>0-2</sub> o heteroalquilo C<sub>1</sub>. En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> es NHR<sup>4</sup> o alquilo C<sub>1</sub>. En algunas realizaciones, R<sup>4</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>. En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de estructura I en donde, R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>-S, X es NH, y R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> (acetamidometilo-cisteína, C(Acm)) ; R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>, X es NH, y R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> (ácido acetildiaminobutanoico, Dab (Ac)); R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>0</sub>, X es NH, R<sup>2</sup> es NHR<sup>4</sup>, y R<sup>4</sup> es H (ácido carbamoildiaminopropanoico, Dap (urea)); o R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, X es NH, y R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> (acetilornitina, Orn (Ac)). En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura II donde, R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>, Y es NHR<sup>4</sup>, y R<sup>4</sup> es CH<sub>3</sub> (metilglutamina, Q (Me)). En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura III donde, R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub> y R<sup>4</sup> es H (metionina-sulfóxido, M(O)); en realizaciones específicas, el aminoácido en la posición 3 está sustituido por Dab (Ac). Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 243-248, 250, 251, y 253 a 256.

40

#### *Modificaciones que afectan a la actividad de GLP-1*

**[0104]** Una mayor actividad en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal por un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster.

45

**[0105]** Una mayor actividad en el receptor de GLP-1 también se proporciona mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29), por ejemplo, mediante la formación de un puente intramolecular entre las cadenas laterales de dos aminoácidos, 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 alfa,alfa-disustituido). Las cadenas laterales de estos aminoácidos pueden estar unidas entre sí a través de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, tales como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes. En algunas realizaciones, se forma el puente entre los aminoácidos que están separados por tres aminoácidos intermedios, es decir, un aminoácido en la posición "i" y un aminoácido en la posición "i + 4", donde i es cualquier número entero entre 12 y 25 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25). En realizaciones de ejemplo, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 13 y 17, 16 y 20, 17 y 21, 20 y 24 o 24 y 28 (pares de aminoácidos en la que i = 12, 16, 20, o 24) están unidos entre sí y por lo tanto estabilizan la hélice alfa de glucagón.

55

60

**[0106]** En otras realizaciones, se forma el puente entre los aminoácidos que están separados por dos aminoácidos intermedios, es decir, un aminoácido en la posición "j" y un aminoácido en la posición "j + 3", en el que j es cualquier número entero de 12 a 26 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26). En realizaciones de ejemplo, j es 17. En otras realizaciones, se forma el puente entre los aminoácidos que están separados por seis aminoácidos intermedios, es decir, un aminoácido en la posición "k" y un aminoácido en la posición "k + 7", en el que k es cualquier número entero de 12 a 22 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 22). En una realización, k es 17.

65

**[0107]** En algunas realizaciones, el puente o enlazador es de aproximadamente 8 (o aproximadamente 7-9) átomos

de longitud, particularmente cuando el puente está entre las posiciones  $i$  e  $i + 4$ . En algunas realizaciones, el puente o enlazador es de aproximadamente 6 (o aproximadamente 5-7) átomos de longitud, particularmente cuando el puente está entre las posiciones  $j$  y  $j + 3$ .

5 **[0108]** En algunas realizaciones, los puentes intramoleculares están formados mediante (a) la sustitución de la serina de origen natural en la posición 16 por ácido glutámico o por otro aminoácido cargado negativamente que tenga una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente por uno cualquiera de glutamina, ácido homocisteico, o ácido homocisteico, o un aminoácido cargado que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo, (por ejemplo, N, O, S, P) y con una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos y (b) la sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 20 por otro aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o tiene una capacidad de enlaces de hidrógeno, y es de al menos aproximadamente 5 (o aproximadamente 4-6) átomos en longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina, u ornitina. Las cadenas laterales de estos aminoácidos en las posiciones 16 y 20 pueden formar un puente salino o pueden estar unidos covalentemente.

15 **[0109]** En una realización, los dos aminoácidos están unidos 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 los aminoácidos, y en una realización la lactama se forma mediante la unión de las cadenas laterales de un aminoácido de lisina a una cadena lateral de ácido glutámico. 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 una Lys12 y Glu16 o, alternativamente, entre un Glu12 y una Lys16)

20 **[0110]** En algunas realizaciones, la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón se logra mediante la formación de un puente intramolecular que no es un puente de lactama. Por ejemplo, se utilizan métodos de unión covalente adecuados incluyen uno cualquiera o más de metátesis de olefinas, ciclación a base de lantionina, puente disulfuro o formación de puente modificado que contiene azufre, el uso de grupos  $\alpha,\omega$ -diaminoalcano, la formación de puentes de metal-átomo, y otros medios de ciclación de péptidos para estabilizar la hélice alfa.

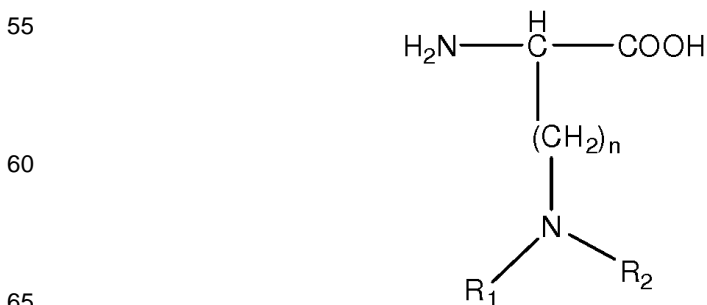
25 **[0111]** La potencia en el receptor de GLP-1 puede aumentar aún más mediante una sustitución de alanina por la arginina nativa en la posición 18.

30 **[0112]** Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 se puede aplicar individualmente o en combinación. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 generalmente proporcionan una mayor actividad de GLP-1 que cualquiera de tales modificaciones tomadas por separado. Por ejemplo, la invención proporciona péptidos que comprenden modificaciones de glucagón en la posición 16, en la posición 20, y en el grupo de ácido carboxílico C-terminal, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; péptidos de glucagón que comprenden modificaciones en la posición 16 y en el grupo de ácido carboxílico C-terminal; péptidos de glucagón que comprenden modificaciones en las posiciones 16 y 20, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; y péptidos de glucagón que comprenden modificaciones en la posición 20 y en el grupo de ácido carboxílico C-terminal.

35 **[0113]** La actividad de GLP-1 actividad puede reducirse al comprender (i) un grupo alfa-carboxilato C-terminal, (ii) una sustitución de Thr en la posición 7 por un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile, (iii) una delección del aminoácido o aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28 (por ejemplo, la delección del aminoácido en la posición 28, la delección del aminoácido en las posiciones 28 y 29) para producir un péptido 27 o 28 aminoácidos de longitud, o (iv) una combinación de los mismos.

40 *Modificaciones que afectan la actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP*

45 **[0114]** Una mayor actividad en cada uno del receptor de glucagón, el receptor de GLP-1, y el receptor de GIP es proporcionada por (i) una sustitución de aminoácidos de Ser en la posición 16 por un aminoácido de fórmula IV:



[Fórmula IV],

en la que n es de 1 a 16, o de 1 a 10, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o 2 a 6, o 2 o 3 o 4 o 5, cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)OH, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)NH<sub>2</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)SH, (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), (alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)(heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)R<sub>7</sub>, y (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)(heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>), en el que R<sub>7</sub> es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre, y (ii) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 por un aminoácido alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 16 es Lys y el aminoácido en la posición 20 es AIB.

**[0115]** La actividad en cada uno de receptor de glucagón, receptor de GLP-1 y receptor de glucagón del análogo que comprende un aminoácido de fórmula IV en la posición 16 y un aminoácido alfa, alfa-disustituido en la posición 20 puede mejorarse aún más mediante la ampliación de la longitud del péptido, por ejemplo, por fusión con un péptido de extensión C-terminal, por ejemplo, de aproximadamente 1-21 aproximadamente 9 a 21, aproximadamente 6-18, aproximadamente 9-12, o aproximadamente 10 u 11 aminoácidos de longitud. En algunas realizaciones, el C-terminal se extiende por fusión a GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), en el que X es Gly o un aminoácido pequeño, alifático o no polar o ligeramente polar. En realizaciones alternativas, el C-terminal se extiende por fusión a GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) y se fusionan 1-11 aminoácidos con el extremo C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95). Por ejemplo, la extensión C-terminal del análogo puede comprender GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) seguido de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 95. Los 1-11 aminoácidos adicionales pueden ser, por ejemplo, un aminoácido alifático pequeño, tal como Ala. En este sentido, la extensión C-terminal puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPSX<sub>m</sub>, donde m es de 1 a 11.

**[0116]** La mejora de la actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP de un análogo a base de glucagón, activo de GIP, incluyendo un análogo que comprende un aminoácido de fórmula IV en la posición 16 y un aminoácido alfa, alfa-disustituido en la posición 20, se puede lograr además tras la acilación o alquilación de un aminoácido situado dentro de una extensión C-terminal o en el aminoácido C-terminal (por ejemplo, un aminoácido que se añade al extremo C-terminal de la extensión C-terminal). La acilación o alquilación pueden ser de un aminoácido situado en, por ejemplo, cualquiera de las posiciones 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, y 50 del análogo extendido por C-terminal. En algunas realizaciones, el aminoácido que está acilado o alquilado se encuentra en la posición 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43 del análogo extendido por C-terminal. En algunas realizaciones, el aminoácido alquilado o acilado es un aminoácido de fórmula I, II o III, por ejemplo, Lys, que está unido a un grupo acilo o alquilo, por ejemplo C10-C22. En ciertas realizaciones, la Lys se encuentra C-terminal a una extensión C-terminal que consiste en SEQ ID NO: 95, tal que la Lys, Dab, Orn u homolys se encuentran en la posición 40 del análogo. Opcionalmente, los péptidos extendidos por C-terminal acilados también se pegilan, por ejemplo, en cualquier posición aquí descrita (por ejemplo, en la posición 24).

**[0117]** La mejora de la actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP de un análogo a base de glucagón, activo de GIP, puede conseguirse además mediante acilación o alquilación de un aminoácido a través de un espaciador (por ejemplo, un aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador hidrófilo bifuncional, espaciador hidrófobo bifuncional). En algunas realizaciones, el análogo a base de glucagón activo de GIP, comprende un grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, cuyo espaciador está unido a la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo. En otras realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal de 1 a 21 aminoácidos (por ejemplo, una extensión que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 95 o 96) C-terminal al aminoácido en la posición 29 y el espaciador, que está unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo, está unido a un aminoácido de la extensión en una posición correspondiente a una de las posiciones 37-43 en comparación con la SEQ ID NO: 1. En realizaciones específicas, el espaciador se une al aminoácido en la posición 40 con respecto a la SEQ ID NO: 1. En ciertas realizaciones, el espaciador es de 3 a 10 átomos de longitud. En aspectos específicos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 átomos de longitud. Por ejemplo, el espaciador puede ser un aminoácido, incluyendo, pero sin limitación, cualquiera de los aquí descritos. También, por ejemplo, el espaciador puede ser un dipéptido o un tripéptido que comprende aminoácidos aquí descritos. El espaciador en aspectos específicos es uno de los siguientes dipéptidos: Ala-Ala, βAla-βAla o γGlu-γGlu. Los espaciadores adecuados para los propósitos de aumentar la actividad en uno o más de los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP se describen adicionalmente en este documento.

#### *Modificaciones que mejoran la resistencia de DPP-IV*

**[0118]** Las modificaciones en la posición 1 y/o 2 pueden aumentar la resistencia del péptido a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Por ejemplo, el aminoácido en la posición 2 puede estar sustituido por D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, N-metil alanina, o ácido aminoisobutírico. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 1 puede estar sustituido por D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina, N-metil-histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, o ácido alfa, alfa-dimetil imidiazol acético (DMIA).

[0119] Se observó que las modificaciones en la posición 2 (por ejemplo AIB en la posición 2) y, en algunos casos, las modificaciones en la posición 1 (por ejemplo, DMIA en la posición 1) pueden reducir la actividad de glucagón, a veces de manera significativa; sorprendentemente, esta reducción en la actividad del glucagón puede ser restaurada mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29), por ejemplo, mediante la formación de un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos, tal como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlace covalente es entre los aminoácidos en las posiciones "i" y "i + 4", o posiciones "j" y "j + 3", por ejemplo, entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, 24 y 28, o 17 y 20. En realizaciones de ejemplo, este enlace covalente es un puente de lactama entre un ácido glutámico en la posición 16 y una lisina en la posición 20. En algunas realizaciones, este enlace covalente es un puente intramolecular que no es un puente de lactama. Por ejemplo, los métodos de unión covalente adecuados (es decir, medios de formación de un puente intramolecular covalente) incluyen uno cualquiera o más de metátesis de olefinas, ciclación a base de lantionina, puente disulfuro o la formación de un puente modificado que contiene azufre, el uso de grupos  $\alpha,\omega$ -diaminoalcano, la formación de puentes de metal-átomo, y otros medios de ciclación de péptidos

#### *Modificaciones que reducen la degradación*

[0120] En más realizaciones de ejemplo, cualquiera de los péptidos de glucagón puede modificarse adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido en la posición 15 y/o 16 de la SEQ ID NO: 1 para reducir la degradación del péptido con el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace péptido Asp15-Ser16. En realizaciones de ejemplo, la modificación de aminoácidos en la posición 15 es una delección o sustitución de Asp por ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. En otras realizaciones de ejemplo, la modificación de aminoácidos en la posición 16 es una delección o sustitución de Ser o Thr por AIB. En otras realizaciones de ejemplo, la Ser en la posición 16 está sustituida por ácido glutámico o por otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con una cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico.

[0121] En algunas realizaciones, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido nativo se modifica, por ejemplo, por delección o sustitución. Tales modificaciones pueden evitar la degradación oxidativa del péptido. En algunas realizaciones, la Met en la posición 27 está sustituida por leucina, isoleucina o norleucina. En algunas realizaciones específicas, la Met en la posición 27 está sustituida por leucina o norleucina.

[0122] En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 se modifica, por ejemplo, por delección o sustitución. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln. En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 está sustituida por Ala o AIB. En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 está sustituida por Lys, Arg, Orn, o citrulina.

[0123] En algunas realizaciones, el Asp en la posición 21 se modifica, por ejemplo, por delección o sustitución. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclica seguida de isomerización a iso-aspartato. En algunas realizaciones, la posición 21 está sustituida por Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico. En algunas realizaciones específicas, la posición 21 está sustituida por Glu.

#### *Otras modificaciones*

[0124] Algunas posiciones del péptido de glucagón natural se pueden modificar a la vez que se conserva al menos algunas de las actividades del péptido parental. Por consiguiente, los solicitantes prevén que uno o más de los aminoácidos situados en las posiciones 2, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 pueden sustituirse por un aminoácido diferente del presente en el péptido de glucagón natural, y todavía retener la actividad en el receptor de glucagón.

[0125] En algunas realizaciones, la posición 18 está sustituida por un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en Ala, Ser, o Thr. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 20 está sustituido por Ser, Thr, Lys, Arg, Orn, citrulina o AIB. En algunas realizaciones, la posición 21 está sustituido por Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos seleccionadas entre las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29. En realizaciones de ejemplo, las modificaciones son una o más sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gln17, Ala18, Glu21, Ile23, Ala24, Val27 y Gly29. En algunas realizaciones, 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-26 difieren del péptido parental. En otras realizaciones, 1-2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-22 difieren del péptido parental. En aún otras realizaciones, las modificaciones son Gln17, Ala18, Glu21, Ile23 y Ala24.

[0126] En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos se añaden al extremo carboxilo del péptido de glucagón. El aminoácido típicamente se selecciona de uno de los 20 aminoácidos comunes, y, en algunas realizaciones, el aminoácido tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. En realizaciones de ejemplo

se selecciona el aminoácido añadido del grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico y glicina.

[0127] Otras modificaciones que no destruyen la actividad incluyen W10 o R20.

- 5 [0128] En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento son modificados mediante el truncamiento del extremo C-terminal por uno o dos residuos de aminoácidos y todavía retienen la actividad y potencia similar en los receptores de glucagón, GLP-1 y/o GIP. En este sentido, el aminoácido en la posición 29 y/o 28 se puede eliminar.

10 *Estabilización de la estructura de la hélice alfa*

- 15 [0129] La estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón (alrededor de 12-29 aminoácidos) proporciona una mayor actividad de GLP-1 y/o GIP y restaura la actividad del glucagón que se ha reducido por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y/o 2. La estructura de hélice alfa puede estabilizarse mediante, por ejemplo, la formación de un puente intramoleculare covalente o no covalente, o sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12 a 29 con un aminoácido estabilizador de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido alfa, alfa-disustituido).

- 20 [0130] En algunas realizaciones, se forma un puente intramoleculare entre dos cadenas laterales de aminoácidos para estabilizar la estructura tridimensional de la parte carboxi terminal (por ejemplo, aminoácidos 12 a 29) del péptido de glucagón. Las cadenas laterales de dos aminoácidos pueden unirse entre sí a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, tales como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes. Cuando las dos cadenas laterales de aminoácidos están unidas entre sí a través de uno o más enlaces covalentes, el péptido puede considerarse que comprende un puente intramoleculare covalente. Cuando las dos cadenas laterales de aminoácidos están unidas entre sí a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, el péptido puede considerarse en el presente documento que comprende un puente intramoleculare no covalente.

- 30 [0131] En algunas realizaciones, se forma el puente intramoleculare entre dos aminoácidos que están 3 aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$ , en donde  $i$  es un número entero entre 12 y 25 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25). 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 la que  $i = 12, 16, 20, \text{ o } 24$ ) están unidos entre sí y por lo tanto estabilizan la hélice alfa de glucagón. Alternativamente,  $i$  puede ser 17.

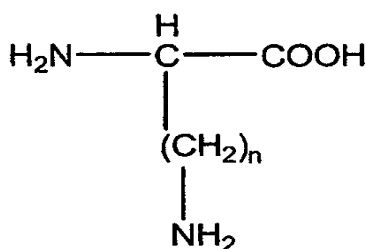
- 35 [0132] En algunas realizaciones específicas, en las que los aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  están unidas por un puente intramoleculare, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 8 átomos, o aproximadamente 7-9 átomos.

- 40 [0133] En otras realizaciones, se forma el puente intramoleculare entre los 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). En algunas realizaciones específicas,  $j$  es 17.

- 45 [0134] En algunas realizaciones específicas, en el que los aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$  están unidos por un puente intramoleculare, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 6 átomos, o aproximadamente 5 a 7 átomos.

- 50 [0135] En otras realizaciones, se forma el puente intramoleculare 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). En algunas realizaciones específicas,  $k$  es 12, 13, o 17. En una realización de ejemplo,  $k$  es 17.

- 55 [0136] 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 aminoácido de la Fórmula I, en la que  $n$  es 2, y ácido homoglutámico y un aminoácido de la Fórmula I, en la que  $n$  es 1, en el que la Fórmula I es:



en la que  $n = 1$  a 4

5

[Fórmula I]

[0137] 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.

[0138] 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).

[0139] 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.

[0140] 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 olefinica puede comprender  $(CH_2)_n$ , 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).

[0141] 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).

[0142] En algunas realizaciones, grupos de  $\alpha,\omega$ -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 enlezadores 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).

5 [0143] En aún otra realización de la invención, 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).

10 [0144] 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).

15 [0145] 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).  
20 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.

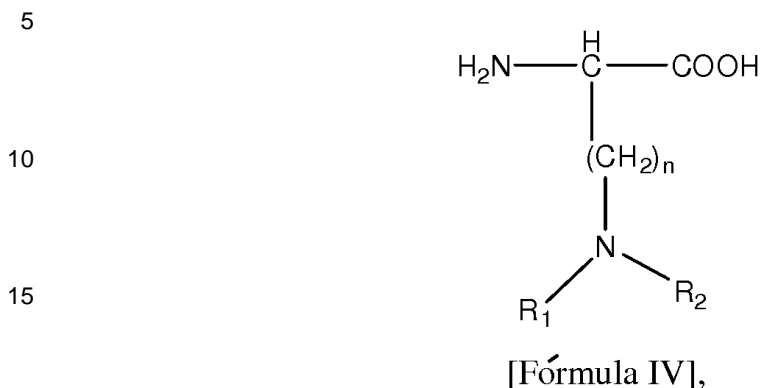
25 [0146] Según una realización, la hélice alfa del péptido de glucagón se estabiliza mediante la incorporación de aminoácidos hidrófobos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$ . Por ejemplo,  $i$  puede ser Tyr e  $i + 4$  puede ser Val o Leu;  $i$  puede ser Phe e  $i + 4$  puede ser Cys o Met;  $i$  puede 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  $i$ .  
30

[0147] Según otras realizaciones de la invención, 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). En una realización específica, el aminoácido estabilizador de la hélice alfa es un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -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, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 del péptido de glucagón están sustituidas por un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido. En una realización específica, una, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21, y 24 están sustituidos por un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido, por ejemplo AIB. Por ejemplo, el péptido de glucagón puede comprender una sustitución de la posición 16 con AIB en ausencia de un puente intramolecular, por ejemplo, un puente intramolecular no covalente (por ejemplo, un puente salino) o un puente intramolecular covalente (por ejemplo, una lactama). Tales péptidos que carecen de un puente intramolecular son ventajosamente fáciles de preparar.  
35  
40

45 [0148] Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón carece de un puente intramolecular comprende una o más sustituciones de aminoácidos dentro de las posiciones 12 a 29 con un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido y un grupo acilo o alquilo unidos covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido del péptido de glucagón, por ejemplo, el aminoácido en las posiciones 10 ó 40 del péptido de glucagón. En realizaciones específicas, el grupo acilo o alquilo es no nativo a un aminoácido de origen natural. En ciertos aspectos, el grupo acilo o alquilo es no nativo al aminoácido en la posición 10. Tales péptidos de glucagón acilado o alquilado que carecen de un puente intramolecular muestran mayor actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón en comparación con los péptidos homólogos no acilados. Una mejora adicional en la actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón se puede lograr por los péptidos de glucagón acilados que carecen de un puente intramolecular mediante la incorporación de un espaciador entre el grupo acilo o alquilo y la cadena lateral del aminoácido en las posiciones 10 o 40 del péptido. La acilación y alquilación, con o sin la incorporación de espaciadores, se describen adicionalmente en este documento.  
50  
55

[0149] En realizaciones específicas, el péptido de glucagón acilado o alquilado, o análogo del mismo, comprende además una modificación que reduce selectivamente la actividad en el receptor de GLP-1. Por ejemplo, el péptido de glucagón acilado o alquilado, o análogo del mismo, comprende uno o una combinación de: un alfacarboxilato C-terminal, una delección de los aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28 (por ejemplo, la delección del aminoácido en la posición 29, la delección de los aminoácidos en las posiciones 28 y 29), una sustitución de Thr en la posición 7 con un aminoácido alifático grande no polar, por ejemplo, Ile. En algunas realizaciones, la posición 16 o la posición 20 está sustituida por un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido, por ejemplo, AIB. En algunas realizaciones, la posición 20 está sustituida por un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido, por ejemplo, AIB. En ciertas realizaciones, la posición 20 está sustituida por un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido, por ejemplo, AIB, y la posición 16 está sustituido por un  
60  
65

aminoácido de fórmula IV



20

25

30

en la que n es de 1 a 16, o de 1 a 10, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o 2 a 6, o 2 o 3 o 4 o 5, cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)OH, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)NH<sub>2</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)SH, (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), (alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)(heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)R<sub>7</sub>, y (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)(heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>), en el que R<sub>7</sub> es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre. En realizaciones particulares, el aminoácido de fórmula IV es ácido 2,3-diamino propiónico (DAP), ácido 2,4-diaminobutírico (DAB), Orn, Lys o homoLys. La combinación de un aminoácido de fórmula IV en la posición 16 y un aminoácido alfa, alfa-disustituido proporciona ventajosamente una mejora en la actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP.

#### Unión de grupos hidrófilos

35

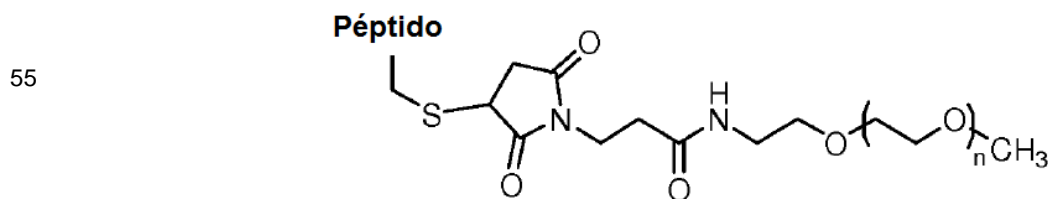
40

45

[0150] 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, azidrina, oxirano, 5-piridilo y grupo acilo alfa-halogenado (por ejemplo, ácido alfa-yodoacético, ácido alfa-bromoacético, ácido alfa-cloroacético). 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).

50

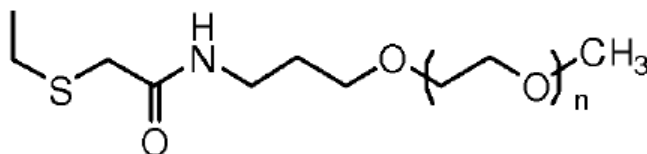
[0151] En un aspecto específico de la invención, un residuo de aminoácido en el péptido de glucagón que tiene un tiol se modifica por un grupo hidrófilo tal como PEG. En algunas realizaciones, el tiol es modificado por PEG activado con maleimida en una reacción de adición de Michael para dar lugar a un péptido PEGilado que comprende el enlace de tioéter mostrado a continuación:



65

[0152] En algunas realizaciones, el tiol se modifica con un PEG activado con haloacetilo en una reacción de sustitución nucleófila para dar como resultado un péptido PEGilado que comprende el enlace de tioéter mostrado a continuación:



**Péptido**

[0153] 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, poliacetales, alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, poli- 1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli (beta-aminoácidos) (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, ácidos colónicos u otros polímeros de polisacáridos, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos.

[0154] 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.

[0155] 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  $\alpha$ 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.

[0156] 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.

[0157] En una realización, el grupo hidrófilo es una cadena de polietilenglicol (PEG), opcionalmente unida al péptido en una o más de las posiciones 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de la extensión C-terminal, por ejemplo, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o en el aminoácido C-terminal (por ejemplo, 40). 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 péptido. En realizaciones de ejemplo, el aminoácido nativo en esa posición está sustituido por un residuo de Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetyl fenilalanina. En otras realizaciones, se añade un aminoácido modificado para comprender un grupo hidrófilo al péptido en el extremo C-terminal.

*Otras modificaciones que mejoran la solubilidad*

[0158] En otra realización, la solubilidad de cualquiera de los péptidos de glucagón se puede mejorar por sustituciones y/o adiciones de aminoácidos que introducen un aminoácido cargado en la parte C-terminal del péptido, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27 de la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, se pueden introducir uno, dos o tres aminoácidos cargados dentro de la parte C-terminal, preferiblemente C-terminal a la posición 27. En algunas realizaciones, el aminoácido o aminoácidos nativos en las posiciones 28 y/o 29 están sustituidos por uno o dos aminoácidos cargados, y/o en una realización adicional también se añaden uno a tres aminoácidos cargados al extremo C-terminal del péptido. En realizaciones de ejemplo, uno, dos o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En algunas realizaciones, el aminoácido cargado negativamente (aminoácido ácido) es ácido aspártico o ácido glutámico. Se pueden realizar modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservativas, al péptido de glucagón que aún permiten que se retenga la actividad de GIP (y opcionalmente la actividad de GLP-1 y/o la actividad glucagón).

*Conjugados y fusión*

- 5 [0159] 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.
- 10 [0160] 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,  $\alpha$ -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.
- 15 [0161] Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más habitualmente con  $\alpha$ -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- $\beta$ -(5-imidazoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.
- 20 [0162] 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.
- 25 [0163] 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.
- 30 [0164] 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.
- 35 [0165] 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-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.
- 40 [0166] Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimidias ( $R-N=C=N-R'$ ), 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.
- 45 [0167] 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.
- 50 [0168] 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.*,
- 55 [0168] 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.*,
- 60 [0168] 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.*,
- 65 [0168] 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).

**[0169]** 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.

**[0170]** 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.

**[0171]** 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).

**[0172]** 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.

**[0173]** 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.

**[0174]** 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).

**[0175]** 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

**[0176]** La presente descripción también abarca péptidos o proteínas de fusión de glucagón, en los que un segundo péptido o polipéptido se ha fusionado a un extremo terminal, por ejemplo, el extremo carboxi terminal del antagonista de glucagón. En algunas realizaciones, el segundo péptido añadido al extremo carboxilo del antagonista de glucagón es GPSSGAPPPS, KRNRNNIA o KRNR unidas al aminoácido 29 del antagonista de glucagón (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo 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 extensiones C-terminals mejoran la solubilidad y también pueden mejorar la actividad del glucagón o GLP-1. En algunas realizaciones, en las que el antagonista de glucagón comprende además una extensión carboxi terminal, el aminoácido carboxi terminal de la extensión termina en un grupo amida o un grupo éster en lugar de un ácido carboxílico.

**[0177]** En algunas realizaciones, por ejemplo, en péptidos de glucagón que comprenden la extensión C-terminal, la treonina en la posición 29 del péptido de glucagón nativo 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 (SEQ ID NO: 95) 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.

**[0178]** 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.

**[0179]** 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*

**[0180]** Según algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en este documento se modifican para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo acilo o alquilo que es no nativo a un aminoácido de origen natural. 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 acción y/o extender la duración de la acción en los receptores de glucagón y/o GLP-1 y/o mejorar la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV y/o mejorar la solubilidad. La actividad en los receptores de glucagón y/o GLP-1 y/o GIP del péptido de glucagón se puede mantener después de la acilación. En algunas realizaciones, la potencia de los péptidos de glucagón acilados es comparable a las versiones no aciladas de los péptidos de glucagón. En realizaciones alternativas, la potencia de los péptidos de glucagón acilados se incrementa en comparación con la de la versión no acilada de los péptidos de glucagón.

**[0181]** En algunas realizaciones, la invención 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. 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, un espaciador bifuncional hidrófilo, o un espaciador bifuncional hidrófobo. 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.

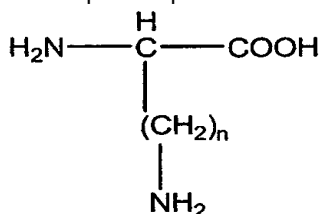
**[0182]** La acilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del péptido de glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido N- o C-terminal, siempre que la actividad de GIP (y opcionalmente la actividad de GLP-1 y/o de glucagón) se conserve, si no mejora. La acilación se puede producir, por ejemplo, en cualquier aminoácido que se añade a la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1), por ejemplo, en el extremo N- o C-terminal. Los ejemplos no limitantes incluyen las posiciones 1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 del péptido de glucagón. El grupo acilo puede unirse covalentemente directamente a un aminoácido del péptido de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del péptido de glucagón través de un espaciador, en el que el espaciador está colocado entre el aminoácido del péptido de glucagón y el grupo acilo. Los péptidos de glucagón pueden acilarse en la misma posición de aminoácidos donde un grupo hidrófilo está unido, o en una posición de aminoácido diferente. Ejemplos no limitantes incluyen la acilación en la posición 10 o la posición 40 y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del péptido de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 o 29, dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

**[0183]** En algunas realizaciones, el péptido de glucagón se modifica para comprender una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 1 o un análogo del mismo y al menos uno de los aminoácidos de la extensión se acila o alquila. Por ejemplo, el péptido de glucagón modificado puede comprender una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29 del péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 1 o análogo del mismo. Alternativamente, si el péptido de glucagón o análogo del mismo está truncado por uno o dos aminoácidos, la extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos puede ser C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28 del péptido de glucagón o análogo del mismo. Por consiguiente, el aminoácido acilado o alquilado dentro de la extensión C-terminal puede ser, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos en la posición 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 del péptido de glucagón extendido por C-terminal. La extensión C-terminal en algunas realizaciones comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 o 96. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende una extensión C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 y 1 a 11 aminoácidos adicionales en el extremo C-terminal de SEQ ID NO: 95, cuyo aminoácido o aminoácidos están acilados o alquilados, tal como se describe en el presente documento. En realizaciones específicas, el aminoácido acilado o alquilado es un residuo de Dab, Orn, Lys, o homoLys y se encuentra en la posición 40 del péptido de glucagón C-terminal extendido o análogo del mismo.

**[0184]** Según una realización, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo que se une al péptido de glucagón a través de un éster, tioéster, o amida para los propósitos de la prolongación de la vida media en circulación y/o retrasar la aparición de y/o extender la duración de la acción y/o mejorar la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV.

**[0185]** En un aspecto específico de la invención, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo por acilación directa de una amina, hidroxilo, o tiol 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 tiol de cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones, la acilación está en la posición 10, 20, 24, 29, o 40. En este sentido, el péptido de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de 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 este documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, 29, y 40 modificado a cualquier aminoácido que comprende una cadena lateral de amina, hidroxilo, o tiol. En algunas realizaciones específicas de la invención, la acilación directa del péptido de glucagón se produce a través de la cadena lateral de amina, hidroxilo, o tiol del aminoácido en la posición 10 o 40.

**[0186]** 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

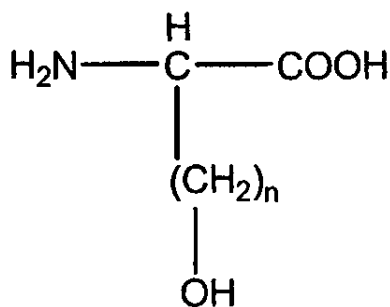
5

[Fórmula I]

10 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).

15 **[0187]** En otras realizaciones, el aminoácido que comprende un grupo hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II:

15



20

25

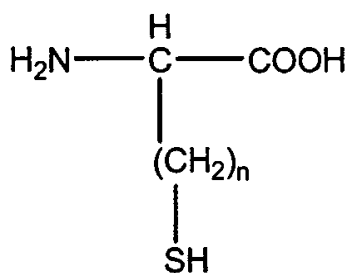
en la que n = 1 a 4  
[Fórmula II]

30

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

35 **[0188]** En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tiol en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula III:

35



40

45

en la que n = 1 a 4  
[Fórmula III]

50

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

55 **[0189]** En otras realizaciones, el aminoácido que comprende una cadena lateral de amina, hidroxilo o tiol es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de fórmula I, fórmula II o fórmula II, excepto que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de fórmula I, fórmula II o fórmula III está sustituido por una segunda cadena lateral.

60 **[0190]** En una realización de la invención, 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.

65 **[0191]** 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  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , 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, 29 y 40 modificado a cualquier aminoácido que comprende amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral.

5 **[0192]** 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.

10 **[0193]** 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, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu.

15 **[0194]** 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.

20 **[0195]** 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.

25 **[0196]** 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.

30 **[0197]** En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófilo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato. En realizaciones específicas, 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).

40 **[0198]** En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófobo. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, GT Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996). En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un carboxilato, y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxiocetanoico y ácido 8-mercaptopocetanoico.

50 **[0199]** En algunas realizaciones, el espaciador bifuncional no es un ácido dicarboxílico que comprende un metileno no ramificado de 1-7 átomos de carbono entre los grupos carboxilato. En algunas realizaciones, el espaciador bifuncional es un ácido dicarboxílico que comprende un metileno no ramificado de 1-7 átomos de carbono entre los grupos carboxilato.

55 **[0200]** El espaciador (por ejemplo, aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrófilo, o espaciador bifuncional hidrófobo) en realizaciones específicas tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos de, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, el espaciador tiene de aproximadamente 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo acilo es un grupo acilo graso C12 a C18, por ejemplo, un grupo acilo graso C14, un grupo acilo graso C16, de manera que la longitud total del espaciador y grupo acilo es de 14 a 28 átomos, por ejemplo, aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 átomos. En algunas realizaciones, la longitud del espaciador y grupo acilo es de 17 a 28 (por ejemplo, 19 a 26, 19 a 21) átomos.

65 **[0201]** Según ciertas realizaciones anteriores, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen natural (incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de los descritos en el presente documento) que comprende una cadena principal de aminoácido que tiene de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico,

ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, y ácido 8-aminooctanoico). Alternativamente, el espaciador puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud. Cada aminoácido del espaciador dipéptido o tripéptido puede ser el mismo que o diferente de otro aminoácido o aminoácidos del dipéptido o tripéptido y puede seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: aminoácidos de origen natural y/o de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los isómeros D o L de los aminoácidos de origen natural (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr), o cualquier isómero D o L de los aminoácidos de origen no natural seleccionados de entre el grupo constituido por:  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala), N- $\alpha$ -metil alanina (Me-Ala), ácido aminobutírico (Abu), ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$ -Abu), ácido aminohexanoico ( $\epsilon$ -Ahx), ácido aminoisobutírico (Aib), ácido aminometilpirrolcarboxílico, ácido aminopiperidincarboxílico, aminoserina (Ams), ácido aminotetrahidropirano-4-carboxílico, arginina N-metoxi-N-metil amida, ácido  $\beta$ -aspártico ( $\beta$ -Asp), ácido azetidín-carboxílico, 3-(2-benzotiazolil) alanina,  $\alpha$ -terc-butilglicina, ácido 2-amino-5-ureido-n-valérico (citrulina, Cit),  $\beta$ -Ciclohexilalanina (Cha), acetamidometilo-cisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilalanina (DOPA), dimetilazolidina (DMTA), ácido  $\gamma$ -glutámico ( $\gamma$ -Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina (Hyp), isoleucina N-metoxi-N-metil amida, metil-isoleucina (Melle), ácido isonipecótico (ISN), metil-leucina (MeLeu), metil-lisina, dimetil-lisina, trimetil-lisina, metanoprolina, metionina-sulfóxido (Met(O)), metionina-sulfona (Met(O<sub>2</sub>)), norleucina (Nle), metil-norleucina (Me-Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), ácido para-aminobenzoico (PABA), penicilamina (Pen), metilfenilalanina (MePhe), 4-clorofenilalanina (Phe (4-Cl)), 4-fluorofenilalanina (Phe (4-F)), 4-nitrofenilalanina (Phe (4-NO<sub>2</sub>)), 4-cianofenilalanina ((Phe (4-CN))), fenilglicina (PHG), piperidinilalanina, piperidinilglicina, 3,4-deshidroprolina, pirrolidinilalanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), O-bencil-fosfoserina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Sta), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilalanina (Thi), O-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O-(bis-dimetilamino-fosfono)-tirosina, tirosina tetrabutilamina sulfato, metil-valina (MeVal), y ácido 3-mercaptopropiónico alquilado.

**[0202]** En algunas realizaciones, el espaciador comprende una carga global negativa, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones, el dipéptido no es ninguno de los dipéptidos de estructura general AB, donde A se selecciona de entre el grupo que consiste en Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe y Pro, en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en Lys, His, Trp. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido se selecciona del grupo que consiste en: Ala-Ala,  $\beta$ -Ala,  $\beta$ -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido  $\gamma$ -aminobutírico-ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

**[0203]** En algunas realizaciones de ejemplo, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo, por 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, 29, o 40, o en el aminoácido C-terminal del péptido de glucagón.

**[0204]** En realizaciones aún más específicas, el grupo acilo está unido al aminoácido en la posición 10 o 40 del péptido de glucagón y, opcionalmente, la longitud del espaciador y grupo acilo es de 14 a 28 átomos. El aminoácido en la posición 10 o 40, en algunos aspectos, es un aminoácido de Fórmula I, por ejemplo, Lys, o un aminoácido disustituido relacionado con la Fórmula I. En realizaciones más específicas, el péptido de glucagón carece de un puente intramolecular, por ejemplo, un puente intramolecular covalente. El péptido de glucagón, por ejemplo, puede ser un péptido que comprende uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB, para la estabilización de la hélice alfa del péptido. Como se muestra en este documento, tales péptidos que comprenden un espaciador acilado unido covalentemente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 40 exhiben mayor potencia en los receptores de GIP, GLP-1, y glucagón.

**[0205]** Los métodos adecuados de acilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos, y tioles son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19 (para los métodos de acilación a través de una amina), Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382 (1996); Shimohigashi y Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982); y Previero et al, *Biochim Biophys Acta* 263: 7-13. (1972) (para métodos de acilación a través de un hidroxilo); y San y Silvius, *J Pept Res* 66: 169-180 (2005) (para los 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., *Pharmacuetical Res.* "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 pág.171-176 (1989).

**[0206]** El grupo acilo del péptido de glucagón acilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones específicas de la invención, el grupo acilo es un ácido graso de C4 a C30. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de un ácido graso C4, ácido graso C6, ácido graso C8, ácido graso C10, ácidos grasos C12, ácido graso C14, ácido graso C16, ácido graso C18, ácido graso C20, ácido graso C22, ácido graso C24, ácido graso C26, ácido graso C28, o un 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.

**[0207]** En una realización alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo, pero no limitado a, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico,



ácido taurocólico, ácido glicocólico, y ácido colesterol.

**[0208]** En algunas realizaciones de la invención, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo, por acilación de un alcano de cadena larga por el péptido de glucagón. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol, y hexadecanotiol) que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del péptido de glucagón. El grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del péptido de glucagón pueden ser parte de una cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico) del péptido de glucagón o pueden ser parte de la cadena principal del péptido.

**[0209]** En ciertas realizaciones, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo por acilación de un alcano de cadena larga por un separador que se une al péptido de glucagón. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del espaciador. Los espaciadores adecuados que comprenden un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, espaciadores bifuncionales, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos.

**[0210]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "forma activada de un grupo carboxilo" se refiere a un grupo carboxilo con la fórmula general  $R(C=O)X$ , en donde X es un grupo saliente y R es el péptido de glucagón o el espaciador. Por ejemplo, las formas activadas de un grupo carboxilo pueden incluir, pero no se limitan a, cloruros de acilo, anhídridos, y ésteres. En algunas realizaciones, el grupo carboxilo activado es un éster con un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) como grupo saliente.

**[0211]** Con respecto a estos aspectos de la invención, en el que se acila un alcano de cadena larga por el péptido de glucagón o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbono. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano C4 a C30. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un alcano C4, alcano C6, alcano C8, alcano C10, alcano C12, alcano C14, alcano C16, alcano C18, alcano C20, alcano C22, alcano C24, alcano C26, alcano C28, o un alcano C30. En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C8 a C20, por ejemplo, un alcano C14, alcano C16, o un alcano C18.

**[0212]** Además, en algunas realizaciones, se acila una amina, hidroxilo, o grupo tiol del péptido de glucagón con un ácido colesterol. En realizaciones específicas, el péptido de glucagón está unido con el ácido colesterol a través de un espaciador de Cys modificado.

**[0213]** 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: 1, incluyendo cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, 29 y 40 comprende un grupo acilo y al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24, 29 ó 40, 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 ó 40, 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.

**[0214]** 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.

**[0215]** En un aspecto específico de la invención, el péptido de glucagón acilado comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 101-106, 113-115, 117-119, 123-125, 128-130, 132-134, 136-138, 141-145, 148, 151, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 163, 165, 166, 231, 234-239, 257, y 258.

**[0216]** Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo alquilo que no es natural en un aminoácido (por ejemplo, un grupo alquilo que es no nativo a un aminoácido natural). Sin que se una a ninguna teoría particular, se cree que la alquilación de péptidos de glucagón logrará similares efectos, si no iguales, que la acilación de los péptidos de glucagón, por ejemplo, una vida media prolongada en la circulación, un retraso en la aparición de la acción, una duración prolongada de la acción, una resistencia mejorada a las proteasas, tales como DPP-IV, y el aumento de la potencia en los receptores GLP-1, GIP, y glucagón.

**[0217]** 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 N- o C-terminal, siempre que la actividad de GIP (y opcionalmente la actividad de GIP y/o glucagón) se mantenga, si no aumenta. La alquilación puede tener lugar, por ejemplo, en cualquier aminoácido que se añade a la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1), por ejemplo, en el extremo N- o C-terminal. Los ejemplos no limitantes incluyen las posiciones 1, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 ó 50. 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 ó 40 y la pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del péptido de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28, 29 ó 40, dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

**[0218]** En un aspecto específico de la invención, 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 péptido de 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, 29 ó 40. 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, 29 y 40 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.

**[0219]** 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).

**[0220]** 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).

**[0221]** 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).

**[0222]** En otras realizaciones, el aminoácido que comprende una amina hidroxilo, o tiol en la cadena lateral, es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, excepto que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de Fórmula I, Fórmula II, o fórmula III se sustituye por una segunda cadena lateral.

**[0223]** En una realización de la invención, 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, 29 o 40 del péptido de glucagón. El aminoácido al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido (por ejemplo, un único aminoácido  $\alpha$ -sustituido o un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido) que comprende un grupo que permite la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , o  $-\text{COOH}$  en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En este sentido, el péptido de glucagón 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, 29 y 40 modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato en la cadena lateral.

**[0224]** 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.

**[0225]** 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, ácido 6-aminoheptanoico, ácido 5-aminoheptanoico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoheptanoico. 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.

5 [0226] 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.

10 [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.

15 [0228] En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófilo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato. En realizaciones específicas, 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).

25 [0229] En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófobo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un carboxilato, y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxiocetanoico y ácido 8-mercaptooctanoico.

35 [0230] El espaciador (por ejemplo, aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrófilo, o espaciador bifuncional hidrófobo) en realizaciones específicas tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos de, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, el espaciador tiene de aproximadamente 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo alquilo es un grupo alquilo C12 a C18, por ejemplo, un grupo alquilo C14, un grupo alquilo C16, de manera que la longitud total del espaciador y grupo alquilo es de 14 a 28 átomos, por ejemplo, aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 átomos. En algunas realizaciones, la longitud del espaciador y grupo alquilo es de 17 a 28 (por ejemplo, 19 a 26, 19 a 21) átomos.

40 [0231] Según ciertas realizaciones anteriores, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen natural que comprende una cadena principal de aminoácido que tiene de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, y ácido 8-aminooctanoico). Alternativamente, el espaciador puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud. El espaciador dipéptido o tripéptido puede estar compuesto de aminoácidos naturales y/o no naturales, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos indicados en el presente documento. En algunas realizaciones, el espaciador comprende una carga global negativa, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido se selecciona del grupo que consiste en: Ala-Ala,  $\beta$ -Ala,  $\beta$ -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido  $\gamma$ -aminobutírico-ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

45 [0232] Los métodos adecuados de alquilación de péptido a través de aminas, hidroxilos, tioles y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una síntesis de éter de Williamson para formar un enlace éter entre un grupo hidroxilo del péptido 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 éter, tioéter, o amino.

50 [0233] El grupo alquilo del péptido de glucagón alquilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, una cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones de la invención, el grupo alquilo es un alquilo C4 a C30. Por ejemplo, el grupo alquilo puede ser cualquiera de un grupo alquilo C4, alquilo C6, alquilo C8, alquilo C10, alquilo C12, alquilo C14, alquilo C16, alquilo C18, alquilo C20, alquilo C22, alquilo C24, alquilo C26, alquilo C28, o un alquilo C30. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C8 a C20, por ejemplo, un alquilo C14 o un alquilo C16.

55 [0234] 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.

5 **[0235]** En algunas realizaciones de la invención, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo por reacción de un alcano nucleófilo de cadena larga con el péptido de glucagón, en el que el péptido de glucagón comprende un grupo saliente adecuado para la sustitución nucleófila. En aspectos específicos, el grupo nucleófilo del alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol, y hexadecanotiol). El grupo saliente del péptido de glucagón puede ser parte de una cadena lateral de un aminoácido o puede ser parte de la cadena principal del péptido. Los grupos salientes adecuados incluyen, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, halógenos, y ésteres de sulfonato.

10 **[0236]** En ciertas realizaciones, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo haciendo reaccionar el alcano nucleófilo de cadena larga con un espaciador que está unido al péptido de glucagón, en el que el espaciador comprende el grupo saliente. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol. En ciertas realizaciones, el espaciador que comprende el grupo saliente puede ser cualquier espaciador discutido en el presente documento, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos que comprende además un grupo saliente adecuado.

20 **[0237]** Con respecto a estos aspectos de la invención, en el que un alcano de cadena larga es alquilado por el péptido de glucagón o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbono. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano C4 a C30. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un alcano C4, alcano C6, alcano C8, alcano C10, alcano C12, alcano C14, alcano C16, alcano C18, alcano C20, alcano C22, alcano C24, alcano C26, alcano C28, o un alcano C30. En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C8 a C20 alcano, por ejemplo, un alcano C14, alcano C16, o un alcano C18.

25 **[0238]** Además, en algunas realizaciones, la alquilación puede tener lugar entre el péptido de glucagón y un resto de colesterol. Por ejemplo, el grupo hidroxilo del colesterol puede desplazar un grupo saliente en el alcano de cadena larga para formar un producto peptídico colesterol-glucagón.

30 **[0239]** Los péptidos de glucagón alquilados descritos en este documento pueden modificarse 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 lograr a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En este sentido, el péptido de glucagón alquilado puede comprender la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en este documento, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, 29, y 40 comprenden un grupo alquilo y al menos uno de los aminoácidos en la posición 16, 17, 21, 24, 29, y 40, 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 o 40, 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.

45 **[0240]** Alternativamente, el péptido de glucagón alquilado puede comprender un espaciador, donde el espaciador está alquilado y modificado para comprender el grupo hidrófilo. 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.

#### *Realizaciones de ejemplo*

50 **[0241]** Según algunas realizaciones, el análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP comprende la SEQ ID NO: 1 con (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, (b) una modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa de la parte C-terminal (aminoácidos 12-29) del análogo, y (c) opcionalmente, de 1 a 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) modificaciones adicionales de aminoácidos. En algunas realizaciones, el análogo muestra al menos aproximadamente 1% de actividad de GIP nativo en el receptor de GIP o cualquier otro nivel de actividad en el receptor GIP descrito aquí.

60 **[0242]** En ciertas realizaciones, la modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa es una que proporciona o introduce un puente intramolecular, incluyendo, por ejemplo, un puente intramolecular covalente, tal como cualquiera de los descritos en este documento. El puente intramolecular covalente, en algunas realizaciones, es un puente de lactama. El puente de lactama del análogo de estas realizaciones puede ser un puente de lactama tal como se describe en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas de puentes de lactama en la sección "estabilización de la estructura de hélice alfa." Por ejemplo, el puente lactama puede ser uno que se encuentra entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , en el que  $i$  es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que  $j$  es 17. En ciertas realizaciones, el puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, en el que uno de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido por Glu y el otro de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido por

Lys.

5 [0243] En realizaciones alternativas, la modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa es la introducción de uno, dos, tres, o cuatro aminoácidos  $\alpha,\alpha$ -disustituidos en la posición o posiciones 16, 20, 21, y 24 del análogo. En algunas realizaciones, el aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido es AIB. En ciertos aspectos, el aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido (por ejemplo, AIB) está en la posición 20 y la posición de aminoácido 16 está sustituida por un aminoácido de carga positiva, tal como, por ejemplo, un aminoácido de fórmula IV, que se describe en este documento. El aminoácido de Fórmula IV puede ser homoLys, Lys, Orn, o ácido 2,4-diaminobutírico (Dab).

10 [0244] En aspectos específicos de la invención, la modificación de aminoácidos en la posición 1 es una sustitución de His por un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol, por ejemplo, un aminoácido aromático grande (por ejemplo, Tyr).

15 [0245] En ciertos aspectos, el análogo de glucagón comprende modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29. Por ejemplo, la Met en la posición 27 puede estar sustituida por un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, la Asn en la posición 28 puede estar sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, Thr en la posición 29 puede estar sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Gly, o una combinación de dos o tres de los anteriores. En realizaciones específicas, el análogo de glucagón comprende Leu en la posición 27, Ala en la posición 28, y Gly o Thr en la posición 29.

20 [0246] En ciertas realizaciones de la invención, el análogo de glucagón comprende una extensión de 1 a 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29. La extensión puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 o 96, por ejemplo. Adicional o alternativamente, el análogo del glucagón puede comprender una extensión de la que 1-6 aminoácidos de la extensión son aminoácidos de carga positiva. Los aminoácidos de carga positiva pueden ser aminoácidos de fórmula IV, incluyendo, pero no limitado a, Lys, homoLys, Orn, y Dab.

30 [0247] El análogo del glucagón en algunas realizaciones está acilado o alquilado tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el grupo acilo o alquilo puede estar unido al análogo de glucagón, con o sin un espaciador, en la posición 10 o 40 del análogo, como se describe adicionalmente en este documento. El análogo puede adicional o alternativamente estar modificado para comprender un grupo hidrófilo como se describe adicionalmente en este documento. Además, en algunas realizaciones, el análogo comprende una cualquiera o una combinación de las siguientes modificaciones:

- 35 (a) Ser en la posición 2 sustituida por D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val, o ácido alfa-amino-N-butírico;  
 (b) Tyr en la posición 10 sustituida por Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;  
 (c) unión de un grupo acilo a una Lys en la posición 10;  
 (d) Lys en la posición 12 sustituida por Arg o Ile;  
 (e) Ser en la posición 16 sustituida por Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o Aib;  
 (f) Arg en la posición 17 sustituida por Gln;  
 40 (g) Arg en la posición 18 sustituida por Ala, Ser, Thr, o Gly;  
 (h) Gln en la posición 20 sustituida por Ser, Thr, Ala, Lys, citrulina, Arg, Orn, o AIB;  
 (i) Asp en la posición 21 sustituido por Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;  
 (j) Val en la posición 23 sustituido por Ile;  
 (k) Gln en la posición 24 sustituida por Asn, Ser, Thr, Ala, o Aib;  
 45 (l) y una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, y 29.

[0248] En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP comprende las siguientes modificaciones:

- 50 (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,  
 (b) un puente de lactama entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , en el que  $i$  es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que  $j$  es 17,  
 (c) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28, y  
 55 (d) 1-9 o 1-6 modificaciones adicionales de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones adicionales de aminoácidos, y la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

60 [0249] El puente lactama del análogo de estas realizaciones puede ser un puente de lactama tal como se describe en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas de puentes de lactama en la sección "estabilización de la estructura de hélice alfa." Por ejemplo, el puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, en el que uno de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido por Glu y el otro de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido por Lys.

65 [0250] Según estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 5-94.

[0251] En otras realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP comprende las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,

(b) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo están sustituidos por un aminoácido alfa, alfa-disustituido,

(c) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28, y

(d) 1-9 o 1-6 modificaciones adicionales de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones adicionales de aminoácidos,

y la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

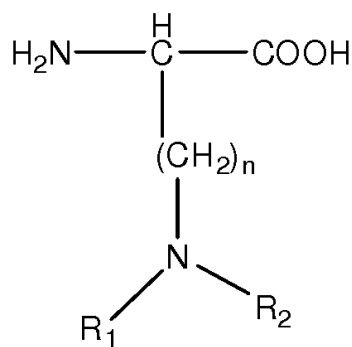
[0252] El aminoácido alfa, alfa-disustituido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido alfa, alfa-disustituido, incluyendo, pero no limitado a, ácido amino isobutírico (AIB), un aminoácido disustituido por el mismo o un grupo diferente seleccionado entre metilo, etilo, propilo y n-butilo, o por un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En ciertas realizaciones, el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB. En ciertas realizaciones, el aminoácido en la posición 20 está sustituido por un aminoácido alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB.

[0253] Según estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 99-141, 144-164, 166-169, y 173-178.

[0254] En aún otros ejemplos de realización, el análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP comprende las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,

(b) una sustitución de aminoácido de Ser en la posición 16 por un aminoácido de fórmula IV:



[Fórmula IV],

en la que n es de 1 a 16, o de 1 a 10, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o 2 a 6, o 2 o 3 o 4 o 5, cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)OH, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)NH<sub>2</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)SH, (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), (alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)(heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)R<sub>7</sub>, y (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)(heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>), en el que R<sub>7</sub> es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre,

(c) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 por un aminoácido alfa, alfa-disustituido,

(d) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28, y

(e) 1-9 o 1-6 modificaciones adicionales de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones adicionales de aminoácidos,

y la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

[0255] El aminoácido de Fórmula IV del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido, tal como, por ejemplo, el aminoácido de fórmula IV, en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16. En ciertas realizaciones, n es 2, 3, 4, o 5, en cuyo caso, el aminoácido es Dab, Orn, Lys, o homoLys, respectivamente.

[0256] El aminoácido alfa, alfa-disustituido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido alfa, alfa-disustituido, incluyendo, pero no limitado a, ácido amino isobutírico (AIB), un aminoácido disustituido por el mismo o un grupo diferente seleccionado entre metilo, etilo, propilo y n-butilo, o por un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En ciertas realizaciones, el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB.

**[0257]** Según estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 99-165.

**[0258]** En aún otros ejemplos de realización, el análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP comprende:

- (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, y
- (b) una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29, en el que al menos uno de los aminoácidos de la extensión está acilado o alquilado, en el que la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

**[0259]** En algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado es un aminoácido de Fórmula I, II, o III. En realizaciones más específicas, el aminoácido de Fórmula I es Dab, Orn, Lys, o homoLys. También, en algunas realizaciones, la extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), en donde X es cualquier aminoácido, o GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 171) o XGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 172), en el que X es Gly o un aminoácido pequeño, alifático o no polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones, los aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservativas con respecto a SEQ ID NO: 95, 96, 170, 171 o 172. En algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en posición 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 del análogo extendido por C-terminal. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 del análogo extendido por C-terminal.

**[0260]** En algunas realizaciones, el análogo que tiene actividad agonista de GIP comprende además modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

**[0261]** En cualquiera de las realizaciones de ejemplo anteriores, la modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP puede ser una sustitución de His por un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. La modificación de aminoácidos en la posición 1 puede, por ejemplo, ser una sustitución de His por un aminoácido grande, aromático. En algunas realizaciones, el aminoácido grande, aromático es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Tyr.

**[0262]** Además, con respecto a las realizaciones de ejemplo anteriores, las modificaciones de aminoácidos en una, dos, o todas las posiciones 27, 28, y 29 puede ser cualquiera de las modificaciones en estas posiciones descritas en este documento. Por ejemplo, la Met en la posición 27 puede estar sustituida por un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, la Asn en la posición 28 puede estar sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y/o la Thr en la posición 29 puede estar sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Gly. Alternativamente, el análogo puede comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

**[0263]** El análogo de las realizaciones de ejemplo anteriores pueden comprender además 1 a 9 o 1 a 6 modificaciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos adicionales, tales como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en este documento que aumentan o disminuyen la actividad en cualquiera de los receptores de GIP, GLP-1, y glucagón, mejoran la solubilidad, mejoran la duración de la acción o la vida media en circulación, retrasan el inicio de la acción, o aumentan la estabilidad. El análogo puede comprender además, por ejemplo, una modificación de aminoácido en la posición 12, opcionalmente, una sustitución por Ile, y/o modificaciones de aminoácidos en las posiciones 17 y 18, opcionalmente la sustitución por Q en la posición 17 y A en la posición 18, y/o una adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), o secuencias que contienen una o más sustituciones conservativas con respecto a SEQ ID NO: 95 o 96, al extremo C-terminal. El análogo puede comprender una o más de las siguientes modificaciones:

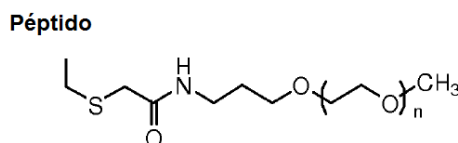
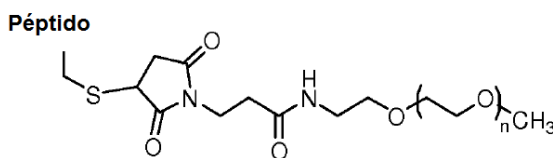
- (i) Ser en la posición 2 sustituida por D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val, o ácido alfa-amino-N-butírico;
- (ii) Tyr en la posición 10 sustituida por Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
- (iii) unión de un grupo acilo a una Lys en la posición 10;
- (iv) Lys en la posición 12 sustituida por Arg ;
- (v) Ser en la posición 16 sustituida por Glu, Gln, ácido homoglutínico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o AIB;
- (vi) Arg en la posición 17 sustituida por Gln;
- (vii) Arg en la posición 18 sustituida por Ala, Ser, Thr, o Gly;
- (viii) Gln en la posición 20 sustituido por Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o AIB;
- (ix) Asp en la posición 21 sustituido por Glu, ácido homoglutínico, ácido homocisteico;
- (x) Val en la posición 23 sustituida por Ile;
- (xi) Gln en la posición 24 sustituida por Asn, Ala, Ser, Thr, o AIB; y
- (xii) una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, y 29.

El análogo en algunas realizaciones comprende una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 3 (por ejemplo, una

sustitución de aminoácido de Gln por Glu), donde el análogo tiene menos de 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 7 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Thr por un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile), donde el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

**[0264]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede unirse covalentemente a un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente al grupo hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, o en el C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95) y una adición de un aminoácido que comprende el grupo hidrófilo, de manera que el grupo hidrófilo está unido covalentemente al análogo en la posición 40.

**[0265]** En algunas realizaciones, el grupo hidrófilo está unido covalentemente a Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina del análogo. Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina pueden ser un aminoácido que es nativo de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1) o puede ser un aminoácido que está sustituyendo un aminoácido natural de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, en el que el grupo hidrófilo está unido a una Cys, la unión con el grupo hidrófilo puede comprender la estructura



**[0266]** Con respecto a los análogos que comprenden un grupo hidrófilo, el grupo hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en este documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección "Unión de grupos hidrófilos." En algunas realizaciones, el grupo hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, por ejemplo, aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

**[0267]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede comprender un aminoácido modificado en el que la cadena lateral está covalentemente unida a un grupo acilo o alquilo (por ejemplo, un grupo acilo o alquilo que es no nativo a un aminoácido de origen natural). El análogo acilado o alquilado puede estar en concordancia con los péptidos acilados o alquilados descritos en la sección "Acilación y alquilación." En algunas realizaciones, el grupo acilo es un grupo acilo graso C4 a C30, tal como, por ejemplo, un grupo acilo o alquilo graso C10, un grupo acilo o alquilo graso C12, un grupo acilo o alquilo graso C14, un grupo acilo o alquilo graso C16, un grupo acilo o alquilo graso C18 o un grupo acilo o alquilo C20, o un grupo acilo o alquilo C22. El grupo acilo o alquilo puede estar unido covalentemente a cualquier aminoácido del análogo, incluyendo, pero no limitado, al aminoácido en la posición 10 o 40, o el aminoácido C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95) y una adición de un aminoácido que comprende el grupo acilo o alquilo, de tal manera que el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente al análogo en la posición 40. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido de Fórmula I, II, o III, por ejemplo, un residuo de Lys. El grupo acilo o alquilo puede estar unido covalentemente a un aminoácido que es nativo de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1) o puede estar unido a un aminoácido que se añade a la secuencia de SEQ ID NO: 1 o a la secuencia de SEQ ID NO: 1 seguido por la SEQ ID NO: 95 (en el extremo N- o C-terminal) o puede estar unido a un aminoácido que sustituye a un aminoácido nativo, por ejemplo, la Tyr en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1.

**[0268]** En las realizaciones de ejemplo anteriores, donde el análogo comprende un grupo acilo o alquilo, el análogo puede estar unido al grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, tal como se describe en el presente documento. El espaciador, por ejemplo, puede ser de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, cualquier aminoácido descrito en el presente documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala,  $\beta$ Ala- $\beta$ Ala, Leu-Leu, Pro-Pro,  $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu), un tripéptido, o un espaciador hidrófilo o hidrófobo bifuncional. En ciertos aspectos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14



a aproximadamente 28 átomos.

**[0269]** En todavía otras realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón que tiene actividad agonista de GIP comprende la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de las SEQ ID NOs: 227, 228, 229 o 230 que comprende además las siguientes modificaciones:

- (a) opcionalmente, una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,
  - (b) una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29, en la que al menos uno de los aminoácidos de la extensión está acilado o alquilado, y
  - (d) hasta 6 modificaciones adicionales de aminoácidos,
- en la que la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

**[0270]** En algunos aspectos, el aminoácido acilado o alquilado es un aminoácido de Fórmula I, II, o III. En realizaciones más específicas, el aminoácido de Fórmula I es Dab, Orn, Lys, o homoLys. También, en algunas realizaciones, el aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), en donde X es cualquier aminoácido, o GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 171) o XGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 172), en las que X es Gly o un aminoácido pequeño alifáticos o no polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones, el aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservativas con respecto a SEQ ID NO: 95, 96, 170, 171 o 172. En algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en posición 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 del análogo extendido por C-terminal. En ciertas realizaciones, el ácido amino acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 del análogo extendido por C-terminal.

**[0271]** En cualquiera de las realizaciones de ejemplo anteriores, el aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP puede ser un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. El aminoácido en la posición 1 puede, por ejemplo, ser un aminoácido grande aromático. En algunas realizaciones, el aminoácido grande aromático es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Tyr.

**[0272]** El análogo de las realizaciones de ejemplo anteriores puede comprender además 1-6 modificaciones adicionales de aminoácidos, tales como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en este documento que aumentan o disminuyen la actividad en cualquiera de los receptores de GIP, GLP-1, y glucagón, mejoran la solubilidad, mejoran la duración de la acción o de la vida media en circulación, retrasan el inicio de la acción, o aumentan la estabilidad.

**[0273]** En ciertos aspectos, los análogos de glucagón descritos en la realización de ejemplo anterior comprenden modificaciones adicionales de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29. Las modificaciones en estas posiciones puede ser cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento en relación con estas posiciones. Por ejemplo, con respecto a SEQ ID NO: 227, 228, 229 o 230, la posición 27 puede estar sustituida por un aminoácido grande alifático (por ejemplo, Leu, Ile o norleucina) o Met, la posición 28 puede estar sustituida por otro aminoácido pequeño alifático (por ejemplo, Gly o Ala) o Asn, y/o la posición 29 pueden estar sustituida por otro aminoácido pequeño alifático (por ejemplo, Ala o Gly) o Thr. Alternativamente, el análogo puede comprender dichas modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

**[0274]** El análogo puede comprender además una o más de las siguientes modificaciones adicionales:

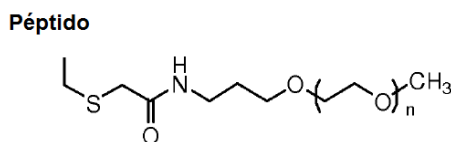
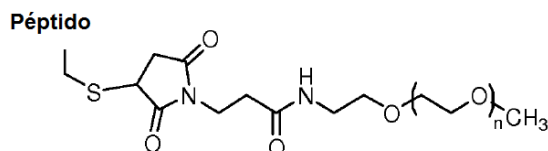
- (i) el aminoácido en la posición 2 es uno cualquiera de D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val, o ácido  $\alpha$ -amino-N-butírico;
- (ii) el aminoácido en la posición 10 es Tyr, Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
- (iii) la unión de un grupo acilo a una Lys en la posición 10;
- (iv) el aminoácido en la posición 12 es Ile, Lys o Arg;
- (v) el aminoácido en la posición 16 es uno cualquiera de Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o AIB;
- (vi) el aminoácido en la posición 17 es Gln o Arg;
- (vii) el aminoácido en la posición 18 es uno cualquiera de Ala, Arg, Ser, Thr, o Gly;
- (viii) el aminoácido en la posición 20 es uno cualquiera de Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o AIB u otro aminoácido alfa, alfa-disustituido;
- (ix) el aminoácido en la posición 21 es uno cualquiera de Glu, Asp, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;
- (x) el aminoácido en la posición 23 es Val o Ile;
- (xi) el aminoácido en la posición 24 es uno cualquiera de Gln, Asn, Ala, Ser, Thr, o AIB; y
- (xii) una o sustituciones más conservativas en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, y 29.

El análogo en algunas realizaciones comprende una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln por Glu), donde el análogo tiene menos de 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 7 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Thr por un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile), donde el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1

en el receptor de GLP-1.

**[0275]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede unirse covalentemente a un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente al grupo hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, o en el C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende un grupo hidrófilo unido covalentemente al análogo en la posición 24.

**[0276]** En algunas realizaciones, el grupo hidrófilo está unido covalentemente a Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina del análogo. Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina pueden ser un aminoácido que es nativo a la SEQ ID NO: 1, 227, 228, 229 o 230 o puede ser un aminoácido sustituido. En algunas realizaciones, en el que el grupo hidrófilo está unido a una Cys, la unión puede comprender la estructura



**[0277]** Con respecto a los análogos que comprenden un grupo hidrófilo, el grupo hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en este documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección "Unión de grupos hidrófilos." En algunas realizaciones, el grupo hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, por ejemplo, aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

**[0278]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede comprender un aminoácido modificado en el que la extensión C-terminal en la que la cadena lateral está covalentemente unida a un grupo acilo o alquilo. El análogo acilado o alquilado puede estar en concordancia con los péptidos acilados o alquilados descritos en la sección "Acilación y alquilación." En algunas realizaciones, el grupo acilo es un grupo acilo graso C4 a C30, tal como, por ejemplo, un grupo acilo o alquilo graso C10, un grupo acilo o alquilo graso C12, un grupo acilo o alquilo graso C14, un grupo acilo o alquilo graso C16, un grupo acilo o alquilo graso C18 o un grupo acilo o alquilo C20, o un grupo acilo o alquilo C22. El grupo acilo o alquilo puede estar unido covalentemente a cualquier aminoácido del análogo, incluyendo, pero no limitado, al aminoácido en la posición 10 o 40, o el aminoácido C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido de Fórmula I, II, o III, por ejemplo, un residuo de Lys. El grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a un aminoácido que es nativo a SEQ ID NO: 1, 227, 228, 229 o 230 o puede estar unido a un aminoácido sustituido. El grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a un aminoácido que es nativo a SEQ ID NO: 95, 96, 171 o 172 o puede estar unido a un aminoácido sustituido.

**[0279]** En las realizaciones de ejemplo anteriores, donde el análogo comprende un grupo acilo o alquilo, el análogo puede estar unido al grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, tal como se describe en el presente documento. El espaciador, por ejemplo, puede ser de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, cualquier aminoácido descrito en el presente documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala,  $\beta$ Ala- $\beta$ Ala, Leu-Leu, Pro-Pro,  $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu), un tripéptido, o un espaciador hidrófilo o hidrófobo bifuncional. En ciertos aspectos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 átomos.

**[0280]** En algunas realizaciones muy específicas, un análogo de la invención comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 99-141, 144-164, 166, 192-207, 209-221 y 223 o seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NOs: 167-169, 173-178 y 225.

**[0281]** Además, los ejemplos específicos de análogos de la invención incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de los que se hace referencia en las Tablas 1-3.

**[0282]** En todavía otras realizaciones de ejemplo el análogo de glucagón que tiene actividad agonista de GIP comprende un grupo acilo o alquilo (por ejemplo, un grupo acilo o alquilo que es no nativo a un aminoácido de origen natural), en el que el grupo acilo o alquilo está unido a un espaciador, en el que (i) el espaciador está unido a la

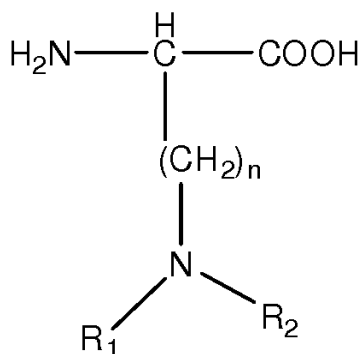
cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo; o (ii) el análogo comprende una extensión de 1 a 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29 y el espaciador está unido a la cadena lateral de un aminoácido correspondiente a una de las posiciones 37-43, con respecto a SEQ ID NO: 1, en el que la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

[0283] En dichas realizaciones, el análogo puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con (i) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, (ii) las modificaciones de aminoácidos en una, dos, o todas las posiciones 27, 28, y 29, (iii) al menos una de:

(A) el análogo comprende un puente de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , en el que  $i$  es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que  $j$  es 17;

(B) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo están sustituidos por un aminoácido alfa, alfa-disustituido; o

(C) el análogo comprende (i) una sustitución de aminoácido de Ser en la posición 16 por un aminoácido de fórmula IV:



[Fórmula IV],

en la que  $n$  es de 1 a 7, cada uno de  $\text{R}_1$  y  $\text{R}_2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ , (alquil  $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ )OH, (alquil  $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ )NH<sub>2</sub>, (alquil  $\text{C}_1\text{-C}_{18}$ )SH, (alquil  $\text{C}_0\text{-C}_4$ )cicloalquilo ( $\text{C}_3\text{-C}_6$ ), (alquilo  $\text{C}_0\text{-C}_4$ )(heterociclo  $\text{C}_2\text{-C}_5$ ), (alquil  $\text{C}_0\text{-C}_4$ ) (arilo  $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ )R<sub>7</sub>, y (alquilo  $\text{C}_1\text{-C}_4$ )(heteroarilo  $\text{C}_3\text{-C}_9$ ), en el que R<sub>7</sub> es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre, y (ii) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 por un aminoácido alfa, alfa-disustituido y (iv) hasta 6 modificaciones adicionales de aminoácidos.

[0284] El aminoácido alfa, alfa-disustituido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido alfa, alfa-disustituido, incluyendo, pero no limitado a, ácido amino iso-butírico (AIB), un aminoácido disustituido por el mismo o un grupo diferente seleccionado entre metilo, etilo, propilo y n-butilo, o por un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En ciertas realizaciones, el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB.

[0285] El aminoácido de Fórmula IV del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido, tal como, por ejemplo, el aminoácido de fórmula IV, en la que  $n$  es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, o 16. En ciertas realizaciones,  $n$  es 2, 3, 4, o 5, en cuyo caso, el aminoácido es Dab, Orn, Lys, o homoLys respectivamente.

[0286] En cualquiera de las realizaciones de ejemplo anteriores, la modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP puede ser una sustitución de His por un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. La modificación de aminoácidos en la posición 1 puede, por ejemplo, ser una sustitución de His por un aminoácido grande aromático. En algunas realizaciones, el aminoácido grande, aromático es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Tyr.

[0287] Además, con respecto a las realizaciones de ejemplo anteriores, las modificaciones de aminoácidos en una, dos, o todas las posiciones 27, 28, y 29 puede ser cualquiera de las modificaciones en estas posiciones descritas en este documento. Por ejemplo, la Met en la posición 27 puede estar sustituida por un aminoácido grande alifático, opcionalmente Leu, Asn en la posición 28 puede estar sustituida por un aminoácido pequeño alifático, opcionalmente Ala, y/o la Thr en la posición 29 puede estar sustituida por un aminoácido pequeño alifático, opcionalmente Gly. Alternativamente, el análogo puede comprender dichas modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

[0288] El análogo de las realizaciones de ejemplo anteriores puede comprender además 1 a 9 o 1 a 6, modificaciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos

adicionales, tales como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en este documento que aumentan o disminuyen la actividad en cualquiera de los receptores de GIP, GLP-1, y glucagón, mejoran la solubilidad, mejoran la duración de la acción o la vida media en circulación, retrasan el inicio de la acción, o aumentan la estabilidad. El análogo puede comprender además, por ejemplo, una modificación de aminoácido en la posición 12, opcionalmente, una sustitución por Ile, y/o modificaciones de aminoácidos en las posiciones 17 y 18, la sustitución opcionalmente por Q en la posición 17 y A en la posición 18, y/o una adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), o secuencias que contienen una o más sustituciones conservativas con respecto a SEQ ID NO: 95 o 96, al extremo C-terminal. El análogo puede comprender una o más de las siguientes modificaciones:

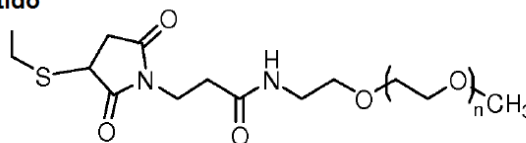
- (i) Ser en la posición 2 sustituida por D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val, o ácido alfa-amino-N-butiérico;
- (ii) Tyr en la posición 10 sustituida por Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
- (iii) unión de un grupo acilo a una Lys en la posición 10;
- (iv) Lys en la posición 12 sustituida por Arg ;
- (v) Ser en la posición 16 sustituida por Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o AIB;
- (vi) Arg en la posición 17 sustituida por Gln;
- (vii) Arg en la posición 18 sustituida por Ala, Ser , Thr, o Gly;
- (viii) Gln en la posición 20 sustituido por Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o AIB;
- (ix) Asp en la posición 21 sustituido por Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;
- (x) Val en la posición 23 sustituida por Ile;
- (xi) Gln en la posición 24 sustituida por Asn, Ala, Ser, Thr, o AIB; y
- (xii) una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, y 29.

El análogo en algunas realizaciones comprende una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln por Glu), donde el análogo tiene menos de 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 7 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Thr por un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile), una delección del aminoácido o aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 27 ó 28, produciendo un péptido de 27 u 28 aminoácidos, donde el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

**[0289]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede unirse covalentemente a un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente al grupo hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, o en el C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 95) y una adición de un aminoácido que comprende el grupo hidrófilo, de manera que el grupo hidrófilo está unido covalentemente al análogo en la posición 40.

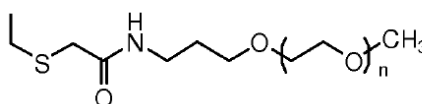
**[0290]** En algunas realizaciones, el grupo hidrófilo está unido covalentemente a Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina del análogo. Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina pueden ser un aminoácido que es nativo de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1) o puede ser un aminoácido que está sustituyendo un aminoácido natural de SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, en el que el grupo hidrófilo está unido a una Cys, la unión con el grupo hidrófilo puede comprender la estructura

**Péptido**



o

**Péptido**



**[0291]** Con respecto a los análogos que comprenden un grupo hidrófilo, el grupo hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en este documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección "Unión de grupos hidrófilos." En algunas realizaciones, el grupo hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, por ejemplo, aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0292] En las realizaciones de ejemplo, donde el análogo comprende un grupo acilo o alquilo, que está unido al grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, tal como se describe en el presente documento. El espaciador, por ejemplo, puede ser de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, cualquier aminoácido descrito en el presente documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala, βAla-βAla, Leu-Leu, Pro-Pro, γGlu-γGlu), un tripéptido, o un espaciador hidrófilo o hidrófobo bifuncional. En ciertos aspectos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 átomos.

[0293] El grupo acilo o alquilo es cualquier grupo acilo o alquilo tal como se describe en el presente documento, tal como un grupo acilo o alquilo que es no nativo a un aminoácido de origen natural. El grupo acilo o alquilo en algunas realizaciones es un grupo acilo graso C4 a C30, tal como, por ejemplo, un grupo acilo o alquilo graso C10, un grupo acilo o alquilo graso C120, un grupo acilo o alquilo graso C14, un grupo acilo o alquilo graso C16 o un grupo acilo o alquilo graso C18, un grupo acilo o alquilo C20, o un grupo acilo o alquilo C22, o un grupo alquilo C4 a C30. En realizaciones específicas, el grupo acilo es un grupo acilo graso C12 a C18 (por ejemplo, un grupo acilo graso C14 o C16).

[0294] En algunas realizaciones, la extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29 del análogo comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO : 96), en donde X es cualquier aminoácido, o GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 171) o XGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 172), en las que X es Gly o un aminoácido pequeño alifático o no polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones, los aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen uno o sustituciones más conservativas con respecto a SEQ ID NO: 95, 96, 170, 171 o 172. En algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 del análogo extendido por C-terminal. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 del análogo extendido por C-terminal.

#### *Composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento*

[0295] En algunos aspectos, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los nuevos péptidos de glucagón descritos en este documento, preferiblemente estéril y preferiblemente a un nivel de pureza de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95 %, 96%, 97%, 98% o 99%, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones pueden contener un péptido de glucagón a una concentración de por lo menos A, donde A es 0,001 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml, 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 otras realizaciones, tales composiciones pueden contener un péptido de glucagón a una concentración de como máximo B, donde B es 30 mg/ml, 25 mg/ml, 24 mg/ml, 23, mg/ml, 22 mg/ml, 21 mg/ml, 20 mg/ml, 19 mg/ml, 18 mg/ml, 17 mg/ml, 16 mg/ml, 15 mg/ml, 14 mg/ml, 13 mg/ml, 12 mg/ml, 11 mg/ml 10 mg/ml, 9 mg/ml, 8 mg/ml, 7 mg/ml, 6 mg/ml, 5 mg/ml, 4 mg/ml, 3 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, o 0,1 mg/ml. En algunas realizaciones, las composiciones pueden contener un péptido de glucagón en un intervalo de concentración de A a B mg/ml, por ejemplo, de 0,001 a 30,0 mg/ml. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones acuosas que se esterilizan y opcionalmente se almacenan dentro de varios recipientes. Los compuestos de la presente invención pueden usarse en algunas realizaciones para preparar soluciones preformuladas listas para la inyección. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un polvo liofilizado. Las composiciones farmacéuticas se pueden además envasar como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para la administración de la composición a un paciente. Los envases o kits pueden ser etiquetados para su almacenamiento a temperatura ambiente o a temperatura refrigerada.

[0296] Los péptidos de glucagón se pueden administrar a un paciente utilizando cualquier vía estándar de administración, incluyendo parenteral, tal como 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.

[0297] En una realización, el kit se proporciona con un dispositivo para administrar la composición de glucagón a un paciente, por ejemplo, la aguja de la jeringa, dispositivo en lápiz, inyector de chorro u otro inyector sin aguja. El kit puede incluir alternativa o adicionalmente uno o más recipientes, por ejemplo, viales, tubos, botellas, jeringas precargadas individuales o de múltiples cámaras, cartuchos, bombas de infusión (implantables o externas), inyectores de chorro, dispositivos en lápiz precargados y similares, que contienen opcionalmente el péptido de glucagón en una forma liofilizada o en una solución acuosa. Preferiblemente, los kits también incluirán instrucciones de uso. En algunas realizaciones el dispositivo de la kit es un dispositivo de dispensación de aerosol, en donde la composición viene preenvasada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización, la composición de glucagón estéril está preenvasada dentro de la jeringa.

[0298] Según una realización, se proporciona una composición farmacéutica en la que la composición comprende un análogo de glucagón activo de GIP de la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender cualquier ingrediente

farmacéuticamente aceptable, incluyendo, por ejemplo, agentes acidificantes, aditivos, adsorbentes, propelentes de aerosoles, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalinizantes, agentes antiapelmazantes, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes de tamponamiento, agentes quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, desecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, 5 disgregantes, dispersantes, agentes potenciadores de disolución, colorantes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de emulsión, cargas, agentes formadores de película, potenciadores del sabor, agentes aromatizantes, potenciadores de flujo, agentes gelificantes, agentes de granulación, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de pomadas, ungüentos, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases pastilla, pigmentos, plastificantes, agentes de pulido, conservantes, agentes secuestrantes, agentes de penetración de la piel, agentes 10 solubilizantes, disolventes, agentes estabilizantes, bases de supositorios, agentes activos de superficie, agentes tensoactivos, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes que incrementan la viscosidad, agentes que absorben agua, codisolventes miscibles en agua, ablandadores de agua, o agentes humectantes.

15 **[0299]** En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno cualquiera o una combinación de los siguientes componentes: acacia, acesulfamo de potasio, citrato de acetiltributilo, citrato de acetiltriethyl, agar, albúmina, alcohol, alcohol deshidratado, alcohol desnaturalizado, diluir alcohol, ácido aleurítico, ácido algínico, poliésteres alifáticos, alúmina, hidróxido de aluminio, estearato de aluminio, amilopectina, alfa-amilosa, ácido 20 ascórbico, palmitato de ascorbilo, el aspartamo, agua bacteriostática para inyección, bentonita, magma de bentonita, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, bronopol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butilparabeno, sodio butilparabeno, alginato de calcio, ascorbato de calcio, carbonato de calcio, ciclamato de calcio, fosfato de calcio dibásico anhidro, fosfato de calcio dihidrato dibásico, fosfato de calcio tribásico, propionato de calcio, silicato de calcio, sorbato de calcio, estearato de calcio, sulfato de calcio, sulfato de calcio hemihidrato, aceite de canola, carbómero, dióxido de carbono, calcio carboximetil 25 celulosa, sodio carboximetil celulosa, beta-caroteno, carragenano, aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado, cera emulsionante catiónico, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, celulosa microcristalina silicificada, la celulosa carboximetil de sodio, alcohol cetosteárico, cetrimida, alcohol cetílico, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, colesterol, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, hidrocloreto de clorhexidina, clorodifluoroetano (HCFC), clorodifluorometano, los clorofluorocarbonos (CFC) chlorophenoxyethanol, cloroxilenol, sólidos de jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro, monohidrato de ácido 30 cítrico, manteca de cacao, agentes colorantes, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmelosa sódica, crospovidona, ácido ciclámico, ciclodextrinas, dextratos, dextrina, dextrosa, dextrosa anhidra, diazolidinilurea, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, dietanolamina, ftalato de dietilo, difluoroetano (HFC), dimetil-beta-ciclodextrina, compuestos de tipo ciclodextrina tales como Captisol (marca registrada, éter de dimetilo, ftalato de dimetilo, edetato de dipotasio, edetato de disodio, hidrógeno fosfato de disodio, 35 edetato calcio, docusato potasio, docusato de sodio, galato de dodecilo, bromuro de dodeciltrimetilamonio, edetato de calcio edetato, ácido edtic, eglumine, alcohol etílico, etilcelulosa, galato de etilo, acetato de laurato, maltol etilo, oleato de etilo, etilparabeno, potasio etilparabeno, sodio etilparabeno, etil vainillina, fructosa, líquido de fructosa, fructosa muele, fructosa libre de pirógenos, fructosa en polvo, ácido fumárico, gelatina, glucosa, glucosa 40 líquida, mezclas de glicéridos de vegetales saturados ácidos grasos, glicerina, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, autoemulsionante monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, glicina, glicoles, glicofurol, goma guar, heptafluoropropano (HFC), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, jarabe de alta fructosa, albúmina de suero humano, hidrocarburos (HC), ácido clorhídrico diluido, aceite vegetal hidrogenado, tipo II, hidroxietil celulosa, hidroxietil-2-beta-ciclodextrina, hidroxipropil celulosa, celulosa de baja sustitución 45 hidroxipropilo, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, imidurea, índigo carmín, intercambiadores de iones, óxidos de hierro, alcohol de isopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, solución salina isotónica, caolín, ácido láctico, lactitol, lactosa, lanolina, alcoholes de lanolina, lanolina anhidra, lecitina, silicato de aluminio de magnesio, carbonato de magnesio, magnesio normales carbonato, anhidro carbonato de magnesio, hidróxido de carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, lauril sulfato de 50 magnesio, óxido de magnesio, silicato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, silicato de magnesio anhidro, ácido málico, malta, maltitol, la solución de maltitol, maltodextrina, maltol, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, meglumina, mentol, metilcelulosa, metacrilato de metilo, oleato de metilo, metilparabeno, el metilparabeno de potasio, metilparabeno de sodio, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica, aceite mineral, aceite mineral ligero, alcoholes de aceite mineral y lanolina, aceite, aceite de oliva, monoetanolamina, montmorillonita, galato de octilo, ácido oleico, ácido palmítico, parafina, aceite de cacahuete, 55 vaselina, vaselina y alcoholes de lanolina, esmalte farmacéutico, fenol, fenol licuado, fenoxietanol, fenoxipropanol, alcohol fenilético, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, polacrilina, polacrilina de potasio, poloxámero, polidextrosa, polietilenglicol, óxido de polietileno, poliácridatos, polímeros de polietileno-polioxiopropileno de bloques, polimetacrilatos, éteres de alquilo de polioxi-etileno, derivados de aceite de ricino de polioxi-etileno, ésteres de ácido graso sorbitol de polioxi-etileno, estearatos de polioxi-etileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, alginato de potasio, benzoato de potasio, bicarbonato de potasio, bisulfato de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, citrato de potasio anhidro, hidrógeno fosfato de potasio, metabisulfato de potasio, fosfato de potasio monobásico, propionato de potasio, sorbato de potasio, povidona, propanol, ácido propiónico, carbonato de propileno, glicol de propileno, alginato de propilenglicol, galato de propilo, propilparabeno, potasio propilparabeno, 60 coloidal de sodio propilparabeno, sulfato de protamina, aceite de colza, solución de Ringer, sacarina, sacarina de amonio, sacarina de calcio, sacarina de sodio, aceite de cártamo, saponita, proteínas de suero, aceite de sésamo,

sílice coloidal, dióxido de silicio, alginato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bicarbonato de sodio, bisulfito de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio anhidro, dihidrato de citrato de sodio, cloruro de sodio, ciclamato de sodio, edetato de sodio, dodecil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sodio fosfato dibásico, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio, tribásico, propionato de sodio anhidro, propionato de sodio, sorbato de sodio, almidón glicolato de sodio, estearil fumarato de sodio, sulfito de sodio, ácido sórbico, ésteres de sorbitán (ésteres grasos de sorbitán), sorbitol, solución de sorbitol 70%, aceite de soja, cera de esperma de ballena, almidón, almidón de maíz, almidón de patata, almidón pregelatinizado, almidón de maíz esterilizable, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, alcohol estearílico, sacarosa, azúcares, azúcar compresible, azúcar de confitería, esferas de azúcar, azúcar invertido, Sugartab, amarillo ocaso FCF, parafina sintética, talco, ácido tartárico, tartrazina, tetrafluoroetano (HFC), aceite de Theobroma, timerosal, dióxido de titanio, alfa tocoferol, acetato de tocoferol, alfa tocoferol succinato ácido, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma tocoferol, tragacanto, triacetina, citrato de tributilo, trietanolamina, citrato de trietilo, trimetil-beta-ciclodextrina, bromuro de trimetiltetradecilamonio, tampón tris, edetato trisódico, vainillina, aceite vegetal hidrogenado tipo I, agua, agua blanda, agua dura, agua libre de dióxido de carbono, agua libre de pirógenos, agua para inyección, agua estéril para inhalación, agua estéril para inyección, agua estéril para irrigación, ceras, cera emulsionante aniónica, cera de carnauba, cera emulsionante catiónica, cera de éster cetílico, cera microcristalina, cera emulsionante no iónica, cera de supositorio, cera blanca, cera amarilla, vaselina blanca, grasa de lana, goma de xantano, xilitol, zeína, propionato de zinc, sales de zinc, estearato de zinc, o cualquier excipiente en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, Tercera Edición, AH Kibbe (Pharmaceutical Press, Londres, Reino Unido, 2000), que se incorpora por referencia en su totalidad. Remington Pharmaceutical Sciences, Decimosexta Edición, EW Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), describe diversos componentes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida que cualquier agente convencional sea incompatible con las composiciones farmacéuticas, se contempla su uso en composiciones farmacéuticas. Los principios activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

**[0300]** Las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento pueden ser diseñados para ser de acción corta, de acción prolongada, de liberación rápida, de liberación sostenida como se describe a continuación. Las formulaciones farmacéuticas también pueden formularse para la liberación inmediata, liberación controlada o para liberación lenta. Las presentes composiciones pueden comprender además, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o efecto de liberación. Las formulaciones farmacéuticas descritas se pueden administrar según cualquier régimen incluyendo, por ejemplo, todos los días (1 vez por día, 2 veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día, 5 veces al día, 6 veces por día), cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanal, quincenal, cada tres semanas, mensual o bimensual.

**[0301]** En algunas realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, al menos A, donde A es 0,0001% p/v, 0,001% p/v, 0,01 % p/v, 0,1% p/v, 1% p/v, 2% p/v, 5% p/v, 10% p/v, 20% p/v, 30% p/v, 40% p/v, 50% p/v, 60% p/v, 70% p/v, 80% p/v, o 90% p/v. En algunas realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tales como, por ejemplo, como máximo B, donde B es 90% p/v, 80% p/v, 70% p/v, 60% p/v, 50% p/v, 40% p/v, 30% p/v, 20% p/v, 10% p/v, 5% p/v, 2% p/v, 1% p/v, 0,1% p/v, 0,001% p/v, o 0,0001%. En otras realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier intervalo de concentración, tal como, por ejemplo, de aproximadamente de A a aproximadamente B. En algunas realizaciones, A es 0,0001% y B es 90%.

**[0302]** Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para lograr un pH fisiológicamente compatible. En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica puede ser de al menos 5, al menos 5,5, al menos 6, al menos 6,5, al menos 7, al menos 7,5, al menos 8, al menos 8,5, al menos 9, al menos 9,5, al menos 10, o al menos 10,5 hasta e incluyendo pH 11, dependiendo de la formulación y vía de administración. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes de tamponamiento para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. Los agentes tampón pueden incluir compuestos capaces de tamponar en el pH deseado, tal como, por ejemplo, tampones de fosfato (por ejemplo, PBS), trietanolamina, Tris, bicina, TAPS, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES, y otros. En ciertas realizaciones, la fuerza del tampón es al menos 0,5 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 30 mM, al menos 40 mM, al menos 50 mM, al menos 60 mM, al menos 70 mM, al menos 80 mM, al menos 90 mM, al menos 100 mM, al menos 120 mM, al menos 150 mM, o al menos 200 mM. En algunas realizaciones, la fuerza del tampón es no más de 300 mM (por ejemplo, como máximo 200 mM, como máximo 100 mM, como máximo 90 mM, como máximo 80 mM, como máximo 70 mM, como máximo 60 mM, como máximo 50 mM, como máximo 40 mM, como máximo 30 mM, como máximo 20 mM, como máximo 10 mM, como máximo 5 mM, como máximo 1 mM).

**[0303]** Los péptidos de glucagón que son coagonistas de GIP/GLP-1, coagonistas de glucagón/GIP y triagonistas de glucagón/GIP/GLP-1 pueden utilizarse en cualquier indicación para la cual cada una de sus actividades ha sido descrita previamente como útil. Por ejemplo, la actividad de glucagón puede aumentar los niveles de glucosa, para tamponar la insulina, o para disminuir la motilidad intestinal durante el examen radiológico. La actividad de GLP-1 puede reducir los niveles de glucosa, una actividad útil para el tratamiento de la hiperglucemia, por ejemplo, diabetes. La actividad de GLP-1 también puede inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso, por

ejemplo, a través de la disminución de apetito. La actividad de GIP también puede disminuir los niveles de glucosa, una actividad útil para el tratamiento de la hiperglucemia, por ejemplo, la diabetes.

**[0304]** Los coagonistas de GIP/GLP-1 y triagonistas de glucagón/GIP/GLP-1 son particularmente ventajosos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso, así como para el tratamiento de la hiperglucemia, incluyendo la diabetes. Los datos in vivo descritos en este documento demuestran que la combinación de la actividad agonista de GIP con la actividad agonista de GLP-1 produce un mayor efecto en la reducción de peso que solo GLP-1. Esta actividad es particularmente inesperada en vista de las enseñanzas en la técnica que antagonizar GIP es deseable para reducir la ingesta de alimentos diaria y el peso corporal, y el aumento de sensibilidad a la insulina y el gasto energético. (Irwin et al, *Diabetologia* 50: 1532-1540 (2007); y Althage et al, *J Biol Chem*, e-publicación el 17 de abril de 2008).

**[0305]** Los datos in vivo descritos en este documento también demuestran que la combinación de la actividad agonista de GIP con la actividad agonista de GIP-1 reduce los niveles de glucosa.

**[0306]** Por lo tanto, se espera que los péptidos glucagón descritos en este documento se utilicen para reducir o mantener el peso corporal, o para el tratamiento de la hiperglucemia, o para reducir el nivel de glucosa en la sangre, o para normalizar y/o estabilizar el nivel de glucosa en la sangre.

**[0307]** En algunas realizaciones, se proporciona un método de tratamiento de la hiperglucemia, o un método para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso, que consiste en administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un péptido de glucagón de la invención. En realizaciones adicionales, se proporcionan métodos de tratamiento de la diabetes que implican la coadministración de una dosis convencional o una dosis reducida de insulina y glucagón un péptido de la invención. También se proporcionan métodos de tratamiento de la diabetes con un péptido de glucagón de la invención, sin coadministración de insulina.

**[0308]** Se espera que tales métodos 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 la insulina, y reducción de las complicaciones de la diabetes, incluyendo nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

**[0309]** Se espera que los métodos para reducir el apetito o la promoción de la pérdida de peso corporal sean útiles en la reducción de peso corporal, la prevención de el aumento de peso, o tratamiento de la obesidad de varias causas, incluyendo la obesidad inducida por fármacos, y la reducción de las complicaciones asociadas con la obesidad, incluyendo la enfermedad vascular (enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, isquemia reperfusión, etc.), la hipertensión, la aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas.

**[0310]** El síndrome metabólico, también conocido como síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome de Reaven, es un trastorno que afecta a más de 50 millones de estadounidenses. El síndrome metabólico se caracteriza típicamente por una agrupación de al menos tres o más de los siguientes factores de riesgo: (1) la obesidad abdominal (tejido graso excesivo en y alrededor del abdomen), (2) la dislipidemia aterogénica (trastornos de grasa en la sangre incluyendo niveles altos de triglicéridos, bajo colesterol HDL y alto colesterol que aumentan la acumulación de placa en las paredes de las arterias), (3) la presión arterial elevada, (4) resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, (5) estado protrombótico (por ejemplo, alto fibrinógeno o inhibidor-1 del activador de plasminógeno en sangre), y (6) estado proinflamatorio (por ejemplo, la proteína C reactiva elevada en la sangre). Otros factores de riesgo pueden incluir el envejecimiento, desequilibrio hormonal y la predisposición genética.

**[0311]** El síndrome metabólico se asocia con un aumento en el riesgo de enfermedad coronaria y otros trastornos relacionados con la acumulación de placa vascular, tal como un accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, que se refiere como enfermedades cardiovascular aterosclerótica (ASCVD). Los pacientes con síndrome metabólico pueden pasar de un estado de resistencia a la insulina en sus primeras etapas a diabetes de tipo II total con mayor riesgo de ASCVD. Sin pretender estar ligado por ninguna teoría en particular, la relación entre la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la enfermedad vascular puede implicar uno o más mecanismos patogénicos simultáneos, incluyendo alteración de la vasodilatación estimulada por la insulina, la reducción asociada con la resistencia a la insulina en la disponibilidad de NO debido al aumento del estrés oxidativo, y anomalías en las hormonas derivada de adipocitos, tales como la adiponectina (Lteif y Mather, *Can J. Cardiol* 20 (supl B): 66B-76B (2004)).

**[0312]** Según el Panel de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación de Colesterol Nacional (ATP III) del 2001, cualquiera de tres de las siguientes características en el mismo individuo cumplen los criterios de síndrome metabólico: (a) la obesidad abdominal (circunferencia de cintura de más de 102 cm en los hombres y más de 88 cm en las mujeres); (b) los triglicéridos séricos (150 mg/dl o superior); (c) el colesterol HDL (40 mg/dl o más bajo en los hombres y 50 mg/dl o menor en las mujeres); (d) la presión arterial (130/85 o más); y (e) de glucosa en sangre en ayunas (110 mg/dl o superior). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un individuo que tiene niveles altos de insulina (una glucemia en ayunas elevada o una glucosa sola después de comida) con al menos dos de los



siguientes criterios cumple con los criterios de síndrome metabólico: (a) la obesidad abdominal (relación cintura a cadera superior a 0,9, un índice de masa corporal de al menos 30 kg/m<sup>2</sup>, o una medida de cintura de más de 37 pulgadas); (b) nivel de colesterol que muestra un nivel de triglicéridos de al menos 150 mg/dl o un colesterol HDL menor que 35 mg/dl; (c) la presión arterial de 140/90 o más, o en tratamiento para la presión arterial alta). (Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome", ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, 11 de mayo de 2009).

**[0313]** Para los propósitos de este documento, si una persona cumple con los criterios de uno o ambos de los criterios establecidos por el Panel de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación de Colesterol Nacional o la OMS, ese individuo es considerado como afectado por el síndrome metabólico.

**[0314]** Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los péptidos de glucagón descritos en este documento son útiles para tratar el síndrome metabólico. Por consiguiente, se describe aquí un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico, o la reducción de uno, dos, tres o más factores de riesgo de los mismos, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un péptido de glucagón descrito en el presente documento en una cantidad eficaz para prevenir o tratar el síndrome metabólico, o el factor de riesgo de los mismos.

**[0315]** La enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) se refiere a un amplio espectro de enfermedad hepática que va desde el hígado graso simple (esteatosis), a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), a cirrosis (cicatrización irreversible avanzada del hígado). Todas las etapas de NAFLD tienen en común la acumulación de grasa (infiltración grasa) en las células hepáticas (hepatocitos). El hígado graso simple es la acumulación anormal de un cierto tipo de grasa, triglicéridos, en las células hepáticas con ninguna inflamación o cicatrización. En NASH, la acumulación de grasa se asocia con grados variables de inflamación (hepatitis) y la cicatrización (fibrosis) del hígado. Las células inflamatorias pueden destruir las células del hígado (necrosis hepatocelular). En los términos "esteatohepatitis" y "esteatonecrosis", esteato se refiere a la infiltración de grasa, hepatitis refiere a la inflamación en el hígado, y la necrosis se refiere a las células hepáticas destruidas. NASH en última instancia puede conducir a la cicatrización del hígado (fibrosis) y a continuación la cicatrización avanzada irreversible (cirrosis). La cirrosis causada por NASH es la última etapa y la más grave en el espectro de hígado graso no alcohólico. (Mendler, Michel, "Hígado graso: enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) y esteatohepatitis no alcohólica (NASH)," ed Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com 29 de agosto, 2005.).

**[0316]** La enfermedad hepática alcohólica, o enfermedad hepática inducida por el alcohol abarca tres enfermedades hepáticas patológicamente distintas relacionadas o causadas por el consumo excesivo de alcohol: hígado graso (esteatosis), hepatitis crónica o aguda, y la cirrosis. La hepatitis alcohólica puede ir desde una hepatitis leve, con pruebas anormales de laboratorio siendo la única indicación de enfermedad, disfunción hepática severa con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), varices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación anormal de la sangre y coma. Histológicamente, la hepatitis alcohólica tiene un aspecto característico, con degeneración globular de los hepatocitos, inflamación con neutrófilos y, a veces cuerpos de Mallory (agregaciones anormales de proteínas de filamentos intermedios celulares). La cirrosis se caracteriza anatómicamente por nódulos generalizados en el hígado combinado con fibrosis. (Worman, Howard J., "Enfermedad hepática alcohólica", sitio web de la Universidad de Columbia Medical Center).

**[0317]** Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los péptidos de glucagón descritos en este documento son útiles para el tratamiento de la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD, o en cualquier etapa de la misma, incluyendo, por ejemplo, esteatosis, esteatohepatitis, hepatitis, inflamación hepática, NASH, cirrosis, o sus complicaciones. Por consiguiente, aquí se describe un método para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, hígado graso no alcohólico, o en cualquier etapa del mismo, en un sujeto que comprende administrar a un sujeto un péptido de glucagón descrito en el presente documento en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, hígado graso no alcohólico, o la etapa de los mismos. Tales métodos de tratamiento incluyen la reducción en uno, dos, tres o más de los siguientes: contenido de grasa en el hígado, la incidencia o la progresión de la cirrosis, la incidencia de carcinoma hepatocelular, los signos de inflamación, por ejemplo, niveles anormales de enzimas hepáticas (por ejemplo, aspartato aminotransferasa AST y/o alanina aminotransferasa ALT o LDH), la ferritina sérica elevada, bilirrubina sérica elevada y/o signos de fibrosis, por ejemplo, los niveles elevados de TGF-beta. En realizaciones preferidas, los péptidos de glucagón se utilizan para tratar a los pacientes que han progresado más allá de hígado graso simple (esteatosis) y muestran signos de inflamación o hepatitis. Tales métodos pueden dar como resultado, por ejemplo, la reducción de AST y/o los niveles de ALT.

**[0318]** Los péptidos de glucagón de la invención pueden ser administrados solos o en combinación con otros agentes antidiabéticos o antiobesidad. Los agentes antidiabéticos conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen la insulina, sulfonilureas como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), gliclazida (Diamicron); meglitinidas, 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 PPARgamma; inhibidores de la alfa-glucosidasa que inhiben la digestión de hidratos de carbono, tales como el miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/acarbosa); exenatida (Byetta) o

pramlintida; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), tales como vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador de glucosa 1 dependiente de sodio); activadores de la glucoquinasa (GKA); antagonistas del receptor de glucagón (GRA); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

5 **[0319]** Los agentes anti-obesidad conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen, leptina y Factor 21 de crecimiento de fibroblastos (FGF-21), supresores del apetito, como los estimulantes de tipo fenetilamina, fentermina (opcionalmente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropión (Tenuate ®), fendimetrazina (Prelu-2 ®, Bontril ®, benzfetamina (Didrex ®, sibutramina (Meridia ®, Reductil ®; rimonabant (Acomplia ®, antagonistas de los receptores de otros 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.

15 **[0320]** Los péptidos de glucagón aquí descritos que retienen los efectos de elevar la glucosa de glucagón en pacientes hipoglucémicos pueden usarse para tratar la hipoglucemia, por ejemplo, para prevenir o tratar la hipoglucemia aguda, periódica o nocturna. Tales péptidos de glucagón también se pueden administrar en combinación con la insulina para amortiguar las acciones de la insulina y ayudar a mantener los niveles estables de glucosa en sangre estable en los diabéticos. En tales realizaciones, se proporciona un método mejorado para regular los niveles de glucosa en sangre en pacientes dependientes de insulina. Los péptidos de glucagón de la presente descripción pueden administrarse conjuntamente con insulina como una composición única, administrarse simultáneamente como soluciones separadas, o alternativamente, la insulina y el péptido de glucagón se pueden administrar en diferentes momentos uno respecto al otro. En algunas realizaciones, el método comprende las etapas de administrar insulina en una cantidad terapéuticamente eficaz para el control de la diabetes y la administración de un péptido de glucagón nuevo modificado de la presente descripción en una cantidad terapéuticamente eficaz para la prevención de la hipoglucemia, en el que dichas etapas de administración se llevan a cabo dentro de los doce horas de diferencia. La proporción exacta del péptido de glucagón modificada con respecto a la insulina administrada dependerá en parte en la determinación de los niveles de glucosa del paciente y de otros parámetros clínicos. "Normalizar" los niveles de sangre significa que el nivel de glucosa en la sangre vuelve a la normalidad (por ejemplo, disminuyendo el nivel de glucosa en la sangre si es mayor de lo normal, o elevando el nivel de glucosa en la sangre si es menor de lo normal). "Estabilizar" el nivel de glucosa en sangre significa la reducción de la variación máxima en el nivel de glucosa en la sangre durante un período de tiempo, por ejemplo, 8 horas, 16 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o 1 semana. Por ejemplo, la administración de péptido de glucagón hace que el nivel de glucosa en sangre con el tiempo se mantenga más cerca del rango normal de valores de glucosa de lo que sería en ausencia de la administración del péptido de glucagón.

35 **[0321]** Los péptidos de glucagón aquí descritos que conservan la actividad deseada se pueden utilizar para inducir la parálisis temporal de los intestinos para usos radiológicos, o para tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles bajos de glucagón. En tales realizaciones se proporciona un método para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal. El método comprende la etapa de administrar uno o más de los péptidos de glucagón descritos en este documento a un paciente.

40 **[0322]** En un aspecto diferente, la invención proporciona un método para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso, o el tratamiento de la hiperglucemia, que comprende coadministrar a un paciente en necesidad del mismo una molécula agonista del receptor de GIP y una molécula agonista del receptor de GLP-1 en cantidades eficaces para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso o disminuir el apetito. Las dos moléculas pueden estar juntas en la misma composición. Alternativamente, una molécula que activa los receptores de GIP y GLP-1 puede administrarse en tales métodos. La combinación de agonista de varios receptores, es decir, la activación de las propiedades proporciona un efecto aditivo o efecto sinérgico inesperado, u otro beneficio o beneficios clínicos inesperados. La administración con una dosis convencional de insulina, una dosis reducida de la insulina, o sin insulina se contempla según tales métodos. Los ejemplos de moléculas agonistas del receptor de GIP incluyen GIP, análogos de GIP, por ejemplo, que retienen al menos 50%, 60%, 70%, o 80% de identidad de secuencia después de una inspección visual después de la alineación para maximizar coincidencias. Ejemplos de moléculas agonistas del receptor de GLP-1 incluyen GLP-1, análogos de GLP-1, por ejemplo, que retienen al menos 50%, 60%, 70%, o 80% de identidad de secuencia después de una inspección visual después de la alineación para maximizar coincidencias o derivados de los mismos. Las moléculas de ejemplo que presentan ambas actividades incluyen péptidos de glucagón de la invención, análogos de GLP-1 que activan los receptores de GLP-1 y GIP, fusiones de GIP y GLP-1, o fusiones de análogos de GIP y análogos de GLP-1, o derivados modificados químicamente de los mismos.

60 **[0323]** Los métodos de tratamiento aquí descritos, incluyendo pero no limitado al tratamiento de la hipoglucemia, puede comprender las etapas de administrar los péptidos de glucagón aquí descritos a un paciente usando cualquier vía estándar de administración, incluyendo parenteral, tal como intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación.

65 **[0324]** Según algunas realizaciones, excluidos de tales métodos, sobre una base de enfermedad por enfermedad, están los análogos de glucagón o análogos de GLP-1 de la técnica anterior descritos como útiles para el tratamiento

de esa enfermedad en particular. En otra realización, los péptidos descritos en la patente de Estados Unidos N° 6.864.069 que actúan tanto como agonista de GLP-1 como un antagonista de glucagón para el tratamiento de la diabetes también pueden ser excluidos. En otra realización, la descripción puede excluir el uso de antagonistas de glucagón para tratar la diabetes, tales como los antagonistas descritos en Unson et al., J. Biol. Chem., 264: 789-794 (1989), Ahn et al, J. Med. Chem., 44: 3109-3116 (2001), y Sapse et al., Mol. Med., 8 (5): 251-262 (2002). En algunas realizaciones, oxintomodulina o un péptido de glucagón que contiene los 8 aminoácidos C-terminales de oxintomodulina (SEQ ID NO: 97) pueden ser excluidos.

**[0325]** La oxintomodulina, una hormona digestiva natural que se encuentra en el intestino delgado, induce la pérdida de peso (véase 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: 97 (KRNRRNNIA). Mientras que la presente invención contempla que los péptidos de glucagón descritos en este documento opcionalmente pueden estar unidos a esta extensión de 8 aminoácidos carboxi terminal (SEQ ID NO: 97), la invención en algunas realizaciones también contempla específicamente péptidos de glucagón que carecen de los 8 aminoácidos carboxi contiguos de la SEQ ID NO: 97.

**[0326]** Cualquiera de los siguientes péptidos se excluyen de los compuestos de la invención, aunque otras modificaciones de los mismos que exhiben la actividad coagonista y triagonista deseada, las composiciones, kits y métodos farmacéuticos de tratamiento usando tales compuestos se pueden incluir en el invención: El péptido de SEQ ID NO: 1 con una sustitución de [Arg12] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Arg12, Lys20] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Arg12, Lys24] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Arg12, Lys29] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con una sustitución [Glu9]; el péptido de SEQ ID NO: 1 con His1 ausente, con sustituciones [Glu9 Glu16, Lys29] y amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Glu9, Glu16, Lys29] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Lys13, Glu17] unidos a través de puente de lactama y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Lys17, Glu21] unidos a través de puente de lactama y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con His1 ausente, con sustituciones [Glu20, Lys24] unidos a través de puente de lactama; los péptidos descritos en el documento PCT/US2008/053857, presentada el 13 de febrero de 2008, PCT/US2006/017494, presentada el 05 de mayo 2006; PCT/US2007/018415, presentada el 17 de agosto 2007; PCT/GB2005/000710, presentada el 25 de febrero de 2005; PCT/GB00/01089, presentada el 29 de marzo de 2000; PCT/US2006/005020, presentada el 10 de febrero 2006.

#### EJEMPLOS

**[0327]** Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante métodos sintéticos estándar, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro método de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no se pueden expresar mediante técnicas estándar de ADN recombinante, las técnicas para su preparación son conocidas en la técnica. Los compuestos de la invención que abarcan partes no peptídicas pueden sintetizarse mediante reacciones estándar de química orgánica, además de las reacciones estándar de química de péptidos cuando sea aplicable. Datos adicionales sobre la actividad de glucagón y GLP-1 de los péptidos de glucagón también se describen en la PCT/US2008/053857, presentada el 13 de febrero de 2008.

#### EJEMPLO 1

##### Protocolo de síntesis general:

**[0328]** 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.

**[0329]** 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].

**[0330]** 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.

## EJEMPLO 2

Protocolo general de pegilación: (Cys-maleimido)

5 **[0331]** 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 ak 0,1%/acetonitrilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para producir los derivados pegilados deseados.

## EJEMPLO 3

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

15 **[0332]** Se introdujeron 0,2 mmol de resina Boc Thr(OBzl) Pam (SynChem Inc) en un recipiente de reacción de 60 ml y se desarrolló la siguiente secuencia en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430 A modificado usando acoplamientos individuales de Fast Boc activado por HBTU

20 HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT

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 (Pennisula 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.

35 **[0333]** 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 Cys<sup>21</sup>, Glucagón Cys<sup>24</sup>, y Glucagón Cys<sup>29</sup> se prepararon de manera similar.

## EJEMPLO 4

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

45 **[0334]** Se colocaron 285 mg (0,2 mmol) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) en un recipiente de reacción de 60 ml y se introdujo la siguiente secuencia y se desarrolló en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando acoplamientos individuales de Fast Boc activado por HBTU.

50 HSQGTFTSD YSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS

**[0335]** 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 (Pennisula 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.

**[0336]** 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 5

##### Glucagón Cys<sup>17</sup> Mal-PEG-5K

**[0337]** Se disolvieron 15,1 mg de Glucagón Cys<sup>17</sup> (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.

**[0338]** 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 (deserción/ionización mediante láser asistida por matriz) mostró un amplio rango de masas (típico de derivados de PEG) de 8.700 a 9.500. Esto demuestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3429) de aproximadamente 5,000 u.m.a.

#### EJEMPLO 6

##### Glucagón Cys<sup>21</sup> Mal-PEG-5K

**[0339]** Se disolvieron 21,6 mg de Glucagón Cys<sup>21</sup> (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.

**[0340]** 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 (deserción/ionización mediante láser asistida por matriz) mostró un amplio rango de masas (típico de derivados de PEG) de 8.700 a 9.700. Esto demuestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3470) de aproximadamente 5,000 u.m.a.

#### EJEMPLO 7

##### Glucagón Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-5K

**[0341]** Se disolvieron 20,1mg de Glucagón C<sup>24</sup> (1-29) y 39,5 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 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 C<sup>24</sup> (3.457,8).

#### EJEMPLO 8

##### Glucagón Cys<sup>24</sup> Mal-PEG-20K

[0342] Se disolvieron 25,7 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> (1-29) y 40,7 mg de mPEG-Mal-20K (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. Después de 6 horas, la relación de material de partida con respecto a producto era de aproximadamente 60:40, según se determinó por HPLC. Se añadieron otros 25,1mg de mPEG-Mal-20K y la reacción se dejó agitar otras 16 horas. La relación de producto no había mejorado de manera significativa, por lo que la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa Kromasil C18 2,2 x 25 cm y se purificó en una FPLC de Pharmacia usando un gradiente de 30% de B a 100% de B durante 450 min. Tampón A = TFA al 0,1%, tampón B = TFA al 0,1%/ACN al 50%, flujo = 4 ml/min, y se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitoriza la UV a 214 nm (2,0 A). Las fracciones que contenían producto homogéneo se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 25,7 mg. La pureza determinada por HPLC analítica fue ~90%. Un análisis espectral de masas MALDI mostró un pico amplio de 23.000 a 27.000 que es aproximadamente 20.000 u.m.a. más que el glucagón C<sup>24</sup> de partida (3.457,8).

## EJEMPLO 9

Glucagón Cys<sup>29</sup> Mal-PEG-5K

[0343] Se disolvieron 20,0 mg de Glucagón Cys<sup>29</sup> (1-29) y 24,7 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. Después de 4 h, se añadieron otros 15,6 mg de mPEG-MAL-5000 para completar la reacción. Después de 8 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en un sistema de FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 75-97 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 40,0 mg de producto que es diferente que el material de partida recuperado en HPLC (fracciones 58-63). El análisis del producto por HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 0% de B a 80 % de B durante 10 min] mostró una pureza superior al 95%. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de un componente de PEG con un rango de masas de 8.000 a 10.000 (máximo a 9025,3) que es 5.540 u.m.a. superior al material de partida (3484,8).

## EJEMPLO 10

Glucagón Cys<sup>24</sup> (2-butirolactona)

[0344] A 24,7 mg de glucagón Cys<sup>24</sup> (1-29) se añadieron 4 ml de bicarbonato de amonio 0,05 M/acetonitrilo al 50% y 5,5 µl de una solución de  $\gamma$ -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.

## EJEMPLO 11

Glucagón Cys<sup>24</sup> (S-carboximetilo)

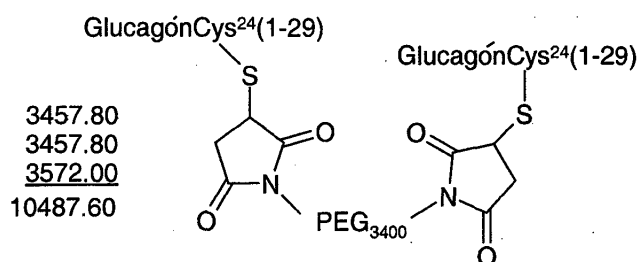
[0345] Se disolvieron 18,1 mg de Glucagón Cys<sup>24</sup> (1-29) en 9,4 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH = 9,2) y se añadieron 0,6 ml de una solución de ácido bromoacético (1,3 mg/ml en acetonitrilo). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se siguió mediante HPLC analítica. Después 1 h se añadieron otros 0,1 ml de una solución de ácido bromoacético. La reacción se agitó otros 60 min, a continuación se acidificó con ácido acético acuoso y se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm para la purificación. Se desarrolló un gradiente de acetonitrilo FPLC de Pharmacia (flujo = 4 ml/min), mientras se recogían fracciones de 5 min y se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 26-29 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir varios mg de producto. La HPLC analítica mostró una pureza del 90% y el análisis espectral de masas MALDI confirmó una masa de 3515 para el producto deseado.

## EJEMPLO 12

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

[0346] Se disolvieron 16 mg de glucagón Cys<sup>24</sup> 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 Cys<sup>24</sup> 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 13

#### Síntesis de lactamas de glucagón

[0347] Se añadieron 285 mg (0,2 mmol) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) a recipientes de reacción de 60 ml y la siguiente secuencia se ensambló en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando acoplamientos individuales activados con Boc DEPBT.

HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH<sub>2</sub> (Lactama 12 -16)

[0348] Se utilizaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg (Tos), Asp (Ochx), Asn (Xan), Glu (OFm), His (BOM), Lys (Fmoc), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Trp (CHO), Tyr (Br-Z). Lys (Cl-Z) se utilizó en la posición 12 si lactamas se construían a partir de 16-20, 20-24, o 24-28. La resina de peptidilo completada se trató con piperidina/dimetilformamida al 20% durante una hora con rotación para eliminar el grupo formilo de Trp, así como la protección Fmoc y OFm de Lys<sub>12</sub> y Glu<sub>16</sub>. Tras la confirmación de la separación por un ensayo de ninhidrina positivo, la resina se lavó con dimetilformamida, seguido de diclorometano y de nuevo con dimetilformamida. La resina se trató con 520 mg (1 mmol) de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP) en dimetilformamida y diisopropiletilamina (DIEA). La reacción procedió durante 8-10 horas y la ciclación se confirmó por una reacción de ninhidrina negativo. La resina se lavó con dimetilformamida, seguido de diclorometano y posteriormente se trató con ácido trifluoroacético durante 10 minutos. La eliminación del grupo Boc se confirmó por una reacción de ninhidrina positiva. La resina se lavó con dimetilformamida y diclorometano y se secó antes de ser transferida a un recipiente de reacción con ácido fluorhídrico (HF). Se añadieron 500 µl de p-cresol junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato de HF (Peninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó, y aproximadamente 10 ml de ácido fluorhídrico líquido se condensaron en el recipiente. La reacción se agitó durante 1 hora en un baño de hielo y se eliminó el HF posteriormente a vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter, y el péptido se solubilizó con 150 ml de acetonitrilo al 20%/ácido acético al 1%.

[0349] Se llevó a cabo un análisis de HPLC analítico del péptido solubilizado crudo bajo las siguientes condiciones [4,6 X 30 mm Xterra C8, 1,50 mL/min, 220 nm, tampón 0,1% TFA/10% de ACN, tampón B 0,1% de TFA/100% de ACN, gradiente 5-95% de B durante 15 minutos]. El extracto se diluyó dos veces con agua y se cargó en una columna de fase inversa preparativa 2,2 X 25 cm Vydac C4 y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo en un sistema de HPLC Waters (tampón A de 0,1% TFA/10% ACN, tampón B de 0,1% TFA/10% CAN y un gradiente de 0-100% de B durante 120 minutos a un caudal de 15,00 ml/min. El análisis por HPLC del péptido purificado mostró más de un 95% de pureza y el análisis espectral de masas de ionización por electrospray confirmó una masa de 3506 Da para la lactama 12-16. Las lactamas a partir de 16-20, 20-24, y 24-28 se prepararon de manera similar.

### EJEMPLO 14

#### Ensayos de solubilidad del glucagón:

[0350] 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  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  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  $\mu$ l de sobrenadante a 1 ml con HCl 0,01 N, y se determina la absorbancia UV (por duplicado).

- 5 **[0351]** La lectura de absorbancia inicial se compensa por el aumento de volumen y se utiliza el siguiente cálculo para establecer el porcentaje de solubilidad:

$$10 \quad \frac{\text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \times 100 = \text{porcentaje de soluble}$$

#### EJEMPLO 15

##### Ensayo de unión al receptor de glucagón

- 15 **[0352]** 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 - [ $^{125}$ I]-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  $\text{IC}_{50}$  se determinaron mediante el uso de software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

#### EJEMPLO 16

##### Ensayo funcional - Síntesis de AMPc

- 35 **[0353]** 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 (receptor de glucagón, receptor de GLP-1 o receptor de GIP) 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, GIP o nuevos análogos de glucagón durante 5 horas a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  en placas "Biocoat" de 96 pocillos recubiertos de poli-D-lisina (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación, se añadieron 100 microlitros de reactivo de sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) a cada pocillo. La placa se agitó brevemente, se incubó 10 min en la oscuro y claro, y el resultado se midió en un contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones con 50% de eficacia se calcularon mediante el uso de software Origin (OriginLab, Northampton, MA).
- 45 EJEMPLO 14

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

- 50 **[0354]** Cada análogo de glucagón se disolvió en agua o PBS y se llevó a cabo un primer análisis HPLC. Después de ajustar el pH (4, 5, 6, 7), las muestras se incubaron durante un período de tiempo especificado a 37°C y se reanalizaron por HPLC para determinar la integridad del péptido. Se determinó la concentración del péptido específico de interés y se calculó el porcentaje intacto restante en relación con el análisis inicial.

#### EJEMPLO 18

##### Preparación de péptidos acilados y/o PEGilados

- 60 **[0355]** 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 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 objetivo de ser acilado (por ejemplo, la posición diez) se sustituye por un residuo de lisina Fmoc en N-epsilon. El tratamiento del péptido protegido con BOC N-terminal completado con piperidina al 20% en DMF durante 30 minutos elimina los grupos formilo/FMOC. El acoplamiento al residuo de Lys con  $\epsilon$ -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



cadena de acilo (por ejemplo, C17-COOH) y PyBOP o reactivo de acoplamiento DEPBT en DMF/DIEA. La eliminación posterior del grupo Fmoc del aminoácido espaciador va seguido por la repetición de acoplamiento con una cadena de acilo. El tratamiento final con 100% de TFA da lugar a la eliminación de cualquier grupo protector de cadena lateral y el grupo BOC N-terminal. Las resinas peptídicas se neutralizan con DIEA al 5%/DMF, se secan, y luego se escinden 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 crudo. Una muestra de la solución se verificó a continuación para ver si contenía el péptido de peso molecular correcto por ESI-MS. Los péptidos correctos se purifican mediante RP-HPLC usando un gradiente lineal de CH<sub>3</sub>CN al 10%/TFA al 0,1% a 0,1% de TFA en 100% de CH<sub>3</sub>CN. Se utiliza una columna de proteína Vydac C18 22 mm x 250 mm para la purificación. Los análogos de péptidos acilados completan la elución generalmente en una relación de tampón de 20:80. Las porciones se agrupan y comprueban la pureza en una RP-HPLC analítica. Las fracciones puras se liofilizan proporcionando péptidos sólidos blancos.

**[0356]** Si un péptido comprende un puente de lactama y residuos diana para ser acilados, la acilación se lleva a cabo como se describe anteriormente tras la adición del aminoácido a la cadena principal del péptido.

**[0357]** Para la pegilación de péptidos, se hace reaccionar 40 kDa de metoxi poli(etilenglicol)maleimido-propionamida (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 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 comienza durante 4-6 horas y la reacción se analiza por RP-HPLC analítica. Los productos PEGilados aparecen claramente distintos del 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 se produce normalmente alrededor de relaciones de tampón de 50:50. Las fracciones de péptido PEGilado puro se recogen y se liofilizan.

**[0358]** Los péptidos se ensayan para determinar la actividad biológica como se describió anteriormente en el Ejemplo 16. Los péptidos acilados pueden exhibir una mayor potencia en el receptor de GLP-1. La inclusión de un espaciador de triptófano puede proporcionar una mejor potencia en el receptor de glucagón.

**[0359]** Aunque la acilación puede extender la vida media de un péptido a horas o más, la PEGilación con repeticiones en intervalos de decenas de kDa puede hacerlo incluso más. Se preparan péptidos que comprenden ambos tipos de modificaciones. Se espera que estos péptidos exhiban una vida media prolongada en la circulación, así como resistencia a la DPP-IV y otras proteasas.

## EJEMPLO 20

### Efecto in vivo en el aumento de peso, apetito y niveles de glucosa en sangre

**[0360]** Los siguientes péptidos fueron sintetizados tal como esencialmente se describe anteriormente.

(A) Un péptido coagonista de glucagón/GLP-1 pegilado (quimera 2 AIB2 C24 40K PEG, que es un péptido quimera 2 (véase el Ejemplo 21) adicionalmente modificado con un AIB en la posición 2, una Cys en 24 que está unida a un grupo PEG 40K);

(B) Un antagonista de GIP pegilado (Pro3 C24 GIP NH<sub>2</sub> (1-42) 40K PEG, que son los aminoácidos 1-42 de GIP (la secuencia de GIP nativo es SEQ ID NO: 4) modificada con una Pro en la posición 3, una Cys en la posición 24, que está unida a un grupo 40K PEG, y una amida en lugar del carboxilato C-terminal);

(C) Un agonista de GIP (AIB2 C24 GIP (1-42) 40K PEG, que son los aminoácidos 1 a 42 de GIP (la secuencia de GIP nativo es SEQ ID NO: 4) modificado con AIB en la posición 2 y una Cys en la posición 24, que está unida a un grupo PEG 40K); y

**[0361]** Los péptidos se ensayaron in vivo mediante inyección subcutánea de ratones obesos inducidos por la dieta (DIO) con varios péptidos, o vehículo solo, QW (70 o 210 nmol/kg/semana). Cada grupo contenía 8 ratones, cada uno con un peso corporal promedio inicial de 50 g. El peso corporal, la composición corporal, la ingesta de alimentos, y los niveles de glucosa en sangre se determinaron periódicamente.

**[0362]** Como se muestra en las figuras 1 a 3, ni el péptido antagonista de GIP ni el péptido agonista de GIP fueron eficaces en reducir el peso corporal, la ingesta de alimentos acumulada, y los niveles de glucosa en sangre en los ratones, en comparación con el coagonista de glucagón/GLP-1 pegilado.

## EJEMPLO 21

### Actividad de los péptidos de glucagón, GIP y GLP-1

**[0363]** Los péptidos de SEQ ID NOs: 5-94 (cada uno de los cuales comprendía una amida en lugar del carboxilato C-terminal) se sintetizaron como se describe esencialmente anteriormente y se analizó in vitro la actividad en el receptor de GIP, el receptor de GLP-1, y los receptores de glucagón mediante el ejemplo 16. La EC<sub>50</sub> de cada

péptido se muestra en la Tabla 1.

TABLA 1

Codigo	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa <sub>i</sub>	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-61	5	0.110	0.190	172.73%	0.180	0.040	22.22%	9.987	0.083	0.83%
mt-62	6	0.450	0.190	42.22%	0.100	0.040	40.00%	5.183	0.083	1.60%
mt-63	7	3.150	0.190	6.03%	0.310	0.040	12.90%	N/D		
mt-66	8	2.000	0.260	13.00%	0.130	0.050	38.46%	N/D		
mt-68	9	1.970	0.260	13.20%	0.820	0.050	6.10%	N/D		
mt-69	10	0.160	0.260	162.50%	0.410	0.050	12.20%	14.601	0.083	0.57%
mt-84	11	0.450	0.060	13.33%	0.160	0.080	50.00%	N/D		
mt-85	12	4.560	0.060	1.32%	0.660	0.080	12.12%	N/D		
mt-92	13	N/A	0.430		0.110	0.060	54.55%	N/D		
mt-93	14	3.000	0.430	14.33%	0.040	0.060	150.00%	N/D		
mt-95	15	280.31	0.100	0.04%	48.920	0.040	0.08%	0.465	0.049	10.54%
mt-96	16	61.70	0.180	0.29%	92.860	0.040	0.04%	0.058	0.049	84.48%
mt-97	17	4.080	0.130	3.19%	2.360	0.030	1.27%	1.745	0.049	2.81%
mt-98	18	957.07	0.100	0.01%	2.820	0.040	1.42%	0.196	0.049	25.00%
mt-99	19	23313	0.180	0.00%	4548.9	0.070	0.00%	0.049	0.049	100.00%
mt-100	20	1459	0.180	0.01%	552.43	0.060	0.01%	0.016	0.049	306.25%
mt-101	21	N/D			N/D			71.312	0.042	0.06%
mt-102	22	798.75	0.180	0.02%	98.38	0.060	0.06%	N/A	0.025	
mt-103		>4000			26.867			.242		
mt-104	23	N/D			N/D			19.069	0.042	0.22%
mt-105	24	N/A	0.046		N/A	0.046		0.552	0.042	7.61%
mt-106	25	165	0.180	0.11%	264.4	0.060	0.02%	N/A	0.025	
mt-107	26	0.070	0.130	185.71%	24.770	0.040	0.16%	3.373	0.025	0.74%
mt-108	27	0.190	0.130	68.42%	0.320	0.040	12.50%	4.781	0.025	0.52%

(continuación)

Código	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-109	28	0.130	0.100	76.92%	3.860	0.030	0.78%	0.658	0.046	6.99%
mt-110	29	0.430	0.100	23.26%	2.020	0.030	1.49%	0.478	0.046	9.62%
mt-111	30	0.270	0.230	85.19%	0.660	0.070	10.61%	6.258	0.049	0.78%
mt-113	31	335.98	0.230	0.07%	172.66	0.070	0.04%	N/A	0.049	
mt-114	32	81.25	0.230	0.28%	143.65	0.070	0.05%	N/A	0.049	
mt-115	33	0.440	0.050	11.36%	0.150	0.030	20.00%	3.576	0.047	1.31%
mt-116	34	0.787	0.147	18.68%	3.798	0.041	1.07%	0.617	0.047	7.62%
mt-118	35	0.040	0.050	125.00%	1.280	0.030	2.34%	0.736	0.047	6.39%
mt-120	36	0.074	0.192	259.46%	0.399	0.054	13.45%	2.622	0.048	1.81%
mt-124	37	2.430	0.210	8.64%	0.040	0.040	100.00%	5.793	0.055	0.95%
mt-125	38	5.740	0.520	9.06%	1.260	0.040	3.17%	0.275	0.054	19.64%
mt-127	39	0.044	0.313	718.39%	0.055	0.048	87.75%	0.518	0.054	10.51%
mt-128	40	0.773	0.086	11.13%	0.120	0.040	33.33%	14.622	0.061	0.42%
mt-129	41	0.952	0.165	17.34%	4.073	0.046	1.12%	2.879	0.059	2.06%
mt-139	42	0.072	0.404	561.11%	0.142	0.059	41.46%	0.569	0.070	12.22%
mt-140	43	0.149	0.196	131.15%	0.068	0.034	49.56%	0.366	0.047	12.85%
mt-141	44	0.150	0.404	269.33%	0.160	0.059	36.78%	0.747	0.075	10.04%
mt-142	45	N/A	0.427		0.041	0.067	163.41%	0.132	0.048	36.36%
mt-143	46	0.086	0.427	496.51%	1.478	0.067	4.53%	2.635	0.048	1.82%
mt-144	47	2.272	0.381	16.77%	0.036	0.051	141.67%	0.480	0.089	18.54%
mt-145	48	0.204	0.096	47.06%	9.936	0.033	0.33%	1.086	0.052	4.79%
mt-146	49	0.020	0.096	480.00%	13.093	0.033	0.25%	0.391	0.052	13.30%
mt-147	50	0.116	0.105	90.52%	0.105	0.036	33.87%	0.144	0.062	43.06%
mt-148	51	4.910	0.105	2.14%	0.098	0.036	36.22%	0.095	0.062	65.26%

(continuación)

Código	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	Actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	Actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	Actividad relativa
mt-149	52	16.315	0.105	0.64%	0.036	0.036	97.53%	0.068	0.062	91.18%
mt-150	53	0.036	0.114	316.67%	3.474	0.038	1.09%	0.232	0.062	26.72%
mt-151	54	0.378	0.114	30.16%	0.126	0.038	30.16%	0.852	0.062	7.28%
mt-152	55	0.293	0.107	36.52%	0.016	0.027	168.75%	0.087	0.036	41.19%
mt-154	56	1.325	0.098	7.40%	2.733	0.019	0.70%	5.530	0.059	1.07%
mt-155	57	1.276	0.140	10.93%	0.025	0.025	98.99%	0.665	0.047	7.02%
mt-156	58	2.965	0.181	6.10%	0.246	0.030	12.20%	0.919	0.041	4.41%
mt-157	59	2.616	0.181	6.92%	0.081	0.030	37.04%	1.013	0.041	4.00%
mt-158	60	1.047	0.156	14.90%	0.034	0.035	102.94%	0.174	0.031	17.82%
mt-162	61	7.002	0.068	0.97%	0.011	0.012	109.09%	0.136	0.035	25.74%
mt-163	62	0.027	0.068	251.85%	0.040	0.012	30.00%	0.740	0.035	4.73%
mt-164	63	0.151	0.166	109.93%	0.046	0.026	56.52%	0.164	0.027	16.46%
mt-165	64	0.489	0.092	18.81%	0.023	0.034	147.83%	0.074	0.020	27.03%
mt-166	65	0.875	0.086	9.83%	0.134	0.036	26.87%	0.320	0.019	5.94%
mt-167	66	0.362	0.125	34.53%	0.315	0.025	7.94%	0.399	0.020	5.01%
mt-168	67	2.607	0.125	4.79%	1.724	0.025	1.45%	6.240	0.020	0.32%
mt-169	68	0.199	0.102	51.26%	0.057	0.031	54.39%	0.142	0.021	14.79%
mt-170	69	3.447	0.041	1.19%	0.202	0.030	14.60%	1.285	0.019	1.44%
mt-172	70	9.162	0.041	0.45%	0.859	0.030	3.43%	7.542	0.019	0.25%
mt-174	71	57.546	0.037	0.06%	0.017	0.020	117.65%	0.023	0.022	95.65%
mt-175	72	2.418	0.036	1.49%	0.220	0.013	5.91%	1.930	0.018	0.93%
mt-176	73	0.141	0.037	26.24%	8.693	0.020	0.23%	0.055	0.022	40.00%
mt-177	74	0.095	0.037	38.95%	21.050	0.022	0.10%	0.114	0.022	19.30%
mt-178	75	8.251	0.035	0.42%	0.171	0.014	8.19%	0.448	0.021	4.69%

(continuación)

Código	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-179	76	1.269	0.037	2.92%	0.260	0.020	7.50%	0.473	0.018	3.74%
mt-182	77	0.212	0.037	17.45%	10.008	0.017	0.17%	0.080	0.018	22.13%
mt-186	78	1.576	0.035	2.22%	0.500	0.014	2.80%	15.209	0.021	0.14%
mt-191	79	1.460	0.063	4.32%	0.011	0.023	209.09%	0.189	0.032	16.93%
mt-192	80	N/A	0.079		47.022	0.026	0.06%	N/A	0.023	
mt-194	81	N/A	0.079		4.157	0.026	0.63%	N/A	0.023	
mt-197	82	47.664	0.063	0.13%	35.297	0.023	0.07%	N/A	0.032	
mt-198	83	11.890	0.063	0.53%	13.219	0.023	0.17%	148.63	0.032	0.02%
mt-199	84	0.214	0.067	31.31%	2.796	0.029	1.04%	0.526	0.029	5.51%
mt-200	85	0.560	0.067	11.96%	0.021	0.029	138.10%	0.631	0.029	4.60%
mt-201	86	26.680	0.063	0.24%	0.012	0.023	191.67%	0.072	0.032	44.44%
mt-202	87	2.360	0.067	2.84%	15.725	0.029	0.18%	2.198	0.029	1.32%
mt-203	88	4.840	0.067	1.38%	0.14	0.029	20.71%	12.175	0.029	0.24%
mt-204	89	108.089	0.067	0.06%	0.018	0.029	161.11%	0.147	0.029	19.73%
mt-205	90	671.760	0.067	0.01%	0.204	0.029	14.22%	1.662	0.029	1.74%
mt-206	91	331.314	0.042	0.01%	0.095	0.031	32.63%	0.115	0.015	13.04%
mt-207	92	3.204	0.042	1.31%	0.073	0.031	42.47%	0.622	0.015	2.41%
mt-208	93	447.792	0.042	0.01%	0.262	0.031	11.83%	0.313	0.015	4.79%
mt-209	94	4.656	0.042	0.90%	2.339	0.031	1.33%	1.053	0.015	1.42%
Actividad relativa es la actividad relativa con respecto a la hormona nativa del receptor indicado										

5  
 [0364] En base a estos datos, se determinó que los péptidos mt-140, mt-147, mt-151, mt-152, mt-158, mt-164, mt-165, mt-166, mt-169, mt-170, mt-172, mt-175 y mt-179 eran péptidos triagonistas de GLP-1/GIP/glucagón de ejemplo, mientras que los péptidos mt-148, mt-149, mt-162, mt-174, mt-178, mt-201, y mt-204 eran de péptidos coagonistas de GLP-1/GIP de ejemplo, y los péptidos mt-116, mt-176, mt-177 y mt-182 eran péptidos coagonistas de GIP/glucagón de ejemplo.

#### EJEMPLO 22

15  
 [0365] Un péptido triagonista de GLP-1/GIP/glucagón (mt-170), un péptido coagonista de GLP-1/GIP (mt-178), y dos péptidos coagonistas de GIP/glucagón (mt-182 y mt-179) del Ejemplo 21 se probaron in vivo mediante inyección subcutánea de ratones obesos inducida por la dieta (DIO) con estos péptidos, un péptido coagonista de glucagón/GLP-1 (quimera 2 AIB2 (secuencia de aminoácidos del glucagón nativo (SEQ ID NO: 1) que comprende las siguientes modificaciones: Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, Lys en la posición 20, Glu en la posición 21, Ile en la posición 23, y Ala en la posición 24, y una amida C-terminal ("Quimera 2") con una modificación adicional de AIB en la posición 2) o Quimera 2 lactama AIB2 (igual que la quimera 2 AIB2 con modificaciones adicionales de Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20, en el que existe un puente de lactama entre las cadenas laterales de Glu16 y Lys20), o vehículo solo, QW (70 o 210 nmol/kg/semana). Cada grupo contenía 8 ratones, cada uno con un peso corporal promedio inicial de 50 g. El peso corporal se determinó periódicamente.

25  
 [0366] Como se muestra en la Figura 4, el triagonista y el coagonista de GLP-1/GIP eran un poco más eficaces para reducir el peso corporal en los ratones que la quimera 2 AIB2, pero no tan eficaz como la quimera 2 lactama AIB2, lo que demuestra la mejor capacidad para reducir el peso corporal. En cambio, ambos coagonistas de GIP/glucagón, y especialmente mt-182, fueron menos eficaces en la reducción de peso corporal.

#### EJEMPLO 23

35  
 [0367] Un péptido triagonista de GLP-1/GIP/glucagón (mt-170) y el péptido coagonista de GLP-1/GIP (mt-178) se probaron in vivo mediante inyección subcutánea de ratones obesos inducida por la dieta (DIO) con estos péptidos, un agonista de GLP (que comprende la SEQ ID NO: 3 con una Glu en la posición 16), o vehículo solo, QW (10 nmol/kg/semana durante 4 semanas o 35 nmol/kg/semana durante 2 semanas). Cada grupo contenía 8 ratones, cada ratón con un peso corporal promedio inicial de 49 g. El peso corporal y los niveles de glucosa en sangre se determinaron periódicamente. Como se muestra en las figuras 5 y 6, tanto el co-agonista de GLP-1/GIP como el triagonista fueron más eficaces en la reducción del peso corporal y los niveles de glucosa en sangre que el agonista de GLP-1.

#### EJEMPLO 24

45  
 [0368] El efecto de la estabilización de la hélice alfa de los análogos a base de glucagón con un aminoácido alfa, alfa-disustituido en lugar de una lactama se investigó mediante la sustitución de la lactama de mt-165 (SEQ ID NO: 64) y de mt-170 (SEQ ID NO: 69) por un AIB en la posición 16. El péptido que comprende la secuencia de mt-165 con un AIB en la posición 16 en lugar de la lactama se denominó "mt-241" y tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 167, mientras que el péptido que comprende la secuencia de mt-170 con un AIB en la posición 16 en lugar de la lactama se denominó "mt-248" y tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 173.

50  
 [0369] Los péptidos lineales adicionales que carecen de un puente de lactama y que comprenden AIB en la posición 16 y/o 20 fueron también realizados esencialmente como se describe anteriormente. Estos péptidos se denominan "mt-242", "mt-249", "mt-250", "mt-251", "mt-252", "mt-255", "mt-258," y "mt-259" y tenían las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 168, 174-176, 107, 108, 177, y 258, respectivamente. La actividad biológica in vitro en los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP de cada uno de estos péptidos se ensayaron tal como se describe esencialmente en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

60

65

TABLA 2

Código	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	Actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	Actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	Actividad relativa
mt-241	167	2.844	0.106	3.73%	0.023	0.030	130.43%	0.252	0.011	4.37%
mt-242	168	1.106	0.106	9.58%	0.102	0.030	29.41%	0.078	0.011	14.10%
mt-248	173	16.712	0.061	0.37%	0.103	0.010	9.71%	3.233	0.017	0.53%
mt-249	174	10.336	0.061	0.59%	0.391	0.010	2.56%	2.710	0.017	0.63%
mt-250	175	0.667	0.042	6.30%	0.033	0.021	63.64%	0.062	0.019	30.65%
mt-251	176	2.758	0.042	1.52%	0.015	0.021	140.00%	0.033	0.019	57.58%
mt-252	107	0.319	0.042	13.17%	0.018	0.021	116.67%	0.013	0.019	146.15%
mt-255	108	5.463	0.134	2.45%	0.018	0.021	116.67%	0.013	0.019	146.15%
mt-258	177	0.4873	0.0686	14.08%	0.0202	0.0119	58.91%	0.0570	0.0096	16.84%
mt-259	178	0.2967	0.0686	23.12%	0.0189	0.0119	62.96%	0.0799	0.0096	12.02%

5 **[0370]** Como se evidencia por los resultados en la Tabla 2, los péptidos lineales que no contienen una lactama proporcionaron actividad en el receptor GIP, así como los receptores de glucagón y/o GLP-1. Más específicamente, mt-242, mt-248, mt-249, mt-250, mt-252, mt-255, nt-258 y mt-259 mostraron actividades de triagonistas de glucagón/GLP-1/GIP, mientras que mt- 251 mostró actividad de un coagonista de GLP-1/GIP. El péptido mt-252, que  
10 tenía una Lys en la posición 16 y un AIB en la posición 20, mostró potencia en los receptores de glucagón y GLP-1 y exhibió una mayor actividad en el receptor de GIP.

EJEMPLO 25

15 **[0371]** Los péptidos lineales que carecen de un anillo de lactama y que comprenden un residuo de Lys o similares en la posición 16 y AIB en la posición 20 se realizaron esencialmente como se describe anteriormente. Los péptidos tenían las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs: 99-141, 144-164, y 166. Los péptidos fueron probados in vitro para la actividad biológica en los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP esencialmente como se describe en el Ejemplo 16. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



TABLA 3

Código	SEQ.IDNO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-252	107	0.319	0.042	13.17%	0.018	0.021	116.67%	0.013	0.019	146.15%
mt-255	108	5.463	0.134	2.45%	0.211	0.041	19.43%	0.115	0.018	15.65%
mt-256	109	58.947	0.0686	0.12%	0.0124	0.0119	95.97%	0.0034	0.0096	282.35%
mt-257	110	0.2109	0.0686	32.53%	0.0303	0.0119	39.27%	0.0232	0.0096	41.38%
mt-260	104	0.3207	0.0213	6.64%	0.0068	0.0175	257.35%	0.0018	0.0105	583.33%
mt-261	105	0.1585	0.0213	13.44%	0.0047	0.0175	372.34%	0.0015	0.0105	700.00%
mt-262	106	0.1343	0.0213	15.86%	0.0044	0.0175	397.73%	0.0027	0.0105	388.89%
mt-263	111	3.1801	0.0213	0.67%	0.0147	0.0175	119.05%	0.0031	0.0105	338.71%
mt-264	112	N/A			N/A			N/A		
mt-265	113	6.4308	0.0436	0.68%	0.9929	0.0176	1.77%	0.0624	0.0085	13.62%
mt-266	114	18.645	0.0436	0.23%	1.5334	0.0176	1.15%	0.1639	0.0085	5.19%
mt-267	115	62.010	0.0436	0.07%	2.0936	0.0176	0.84%	1.3122	0.0085	0.65%
mt-268	116	6.5002	0.0436	0.67%	0.0155	0.0176	113.55%	0.0047	0.0085	180.85%
mt-269	117	183.4936	0.1964	0.11%	0.0136	0.0197	144.85%	0.0057	0.0080	140.35%
mt-270	118	305.77	0.1964	0.06%	0.0093	0.0197	211.83%	0.0049	0.0080	163.27%
mt-271	119	112.980	0.1964	0.17%	0.0106	0.0197	185.85%	0.0056	0.0080	142.86%
mt-272	120	1060.8	0.1964	0.02%	1.2293	0.0197	1.60%	0.0241	0.0080	33.20%
mt-274	99	69.087	0.0417	0.06%	0.0916	0.0071	7.75%	0.0350	0.0139	39.71%
mt-275	121	0.0671	0.0417	62.15%	0.0068	0.0071	104.41%	0.0124	0.0139	112.10%
mt-276	122	0.0537	0.0417	77.65%	0.0066	0.0071	107.58%	0.0080	0.0139	173.75%
mt-277	123	0.0215	0.0506	235.35%	0.0086	0.0193	224.42%	0.0052	0.0237	455.77%
mt-278	124	0.0086	0.0506	588.37%	0.0042	0.0193	459.52%	0.0028	0.0237	846.43%
mt-279	125	0.0069	0.0506	733.33%	0.0046	0.0193	419.57%	0.0045	0.0237	526.67%
mt-280	126	0.0677	0.0506	74.74%	0.0126	0.0193	153.17%	0.0149	0.0237	159.06%

(continuación)

Código	SEQ.ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-281	127	0.2816	0.0469	16.65%	0.2165	0.0111	5.13%	0.39996	0.0267	6.68%
mt-282	128	2.4367	0.0287	1.18%	0.0134	0.0059	44.03%	0.0133	0.0102	76.69%
mt-283	129	7.9431	0.0287	0.36%	0.0158	0.0059	37.34%	0.0122	0.0102	83.61%
mt-284	130	4.1686	0.0287	0.69%	0.0155	0.0059	38.06%	0.0186	0.0102	54.84%
mt-285	131	12.622	0.0287	0.23%	0.7844	0.0059	0.75%	0.0280	0.0102	36.43%
mt-286	132	0.0612	0.0519	84.80%	0.0225	0.0117	52.00%	0.0159	0.0109	68.55%
mt-287	133	0.0187	0.0519	277.54%	0.0124	0.0117	94.35%	0.0093	0.0109	117.20%
mt-288	134	0.0207	0.0519	250.72%	0.0138	0.0117	84.78%	0.0137	0.0109	79.56%
mt-289	135	0.0766	0.0519	67.75%	0.0144	0.0117	81.25%	0.0234	0.0109	46.58%
mt-290	136	0.0530	0.0603	113.77%	0.0117	0.0183	156.41%	0.0329	0.0078	23.71%
mt-291	137	0.0159	0.0603	379.25%	0.0057	0.0183	321.05%	0.0086	0.0078	90.70%
mt-292	138	0.0133	0.0603	453.38%	0.0044	0.0183	415.91%	0.0082	0.0078	95.12%
mt-293	139	1.6442	0.0603	3.67%	0.2223	0.0183	8.23%	0.1638	0.0078	4.76%
mt-295	140	87.2847	0.0235	0.03%	0.1143	0.0077	6.74%	0.0577	0.0110	19.06%
mt-296	141	0.4214	0.0478	11.34%	0.0124	0.0162	130.65%	0.0077	0.0163	211.69%
mt-297	142	0.0132	0.0478	362.12%	0.0129	0.0162	125.58%	0.0168	0.0163	97.02%
mt-298	101	1.7571	0.0638	3.63%	0.0087	0.0157	180.46%	0.0051	0.0206	403.92%
mt-299	143	0.0260	0.0638	245.38%	0.0087	0.0157	180.46%	0.0439	0.0206	46.92%
mt-306	144	1.4950	0.0478	3.20%	0.0201	0.0162	80.60%	0.0064	0.0163	254.69%
mt-307	145	0.2878	0.0478	16.61%	0.0143	0.0162	113.29%	0.0127	0.0163	128.35%
mt-308	146	12.1920	0.0478	0.39%	0.0237	0.0162	68.35%	0.0057	0.0163	285.96%
mt-309	102	3.6109	0.0638	1.77%	0.0104	0.0157	150.96%	0.0091	0.0206	226.37%
mt-310	103	0.7747	0.0638	8.24%	0.0062	0.0157	253.23%	0.0075	0.0206	274.67%
mt-311	100	197.2482	0.0638	0.03%	0.2174	0.0157	7.22%	0.0545	0.0206	37.80%

(continuación)

Código	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
		EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-323	148	0.2169	0.0846	39.00%	0.0571	0.0203	35.55%	0.0084	0.0103	122.62%
mt-324	149	1.2332	0.0791	6.41%	0.2303	0.0223	9.68%	0.0387	0.0117	30.23%
mt-325	150	0.0915	0.0791	86.45%	2.6828	0.0223	0.83%	0.0105	0.0117	111.43%
mt-331	153	408.0393	0.0846	0.02%	0.4484	0.0203	4.53%	0.0968	0.0103	10.64%
mt-333	154	0.6905	0.0193	2.80%	0.0028	0.0024	85.71%	0.0034	0.0077	226.47%
mt-334	155	7.0725	0.0193	0.27%	0.0034	0.0024	70.59%	0.0041	0.0077	187.80%
mt-335	156	1.5956	0.0193	1.21%	0.0018	0.0024	133.33%	0.0047	0.0077	163.83%
mt-336	157	1561.65	0.0193	0.00%	0.0334	0.0024	7.19%	0.0395	0.0077	19.49%
mt-337	158	106.3826	0.0248	0.02%	0.0082	0.0061	74.39%	0.0080	0.0092	115.00%
mt-338	159	295.3407	0.0248	0.01%	0.2256	0.0061	2.70%	0.0234	0.0092	39.32%
mt-339	160	8.7218	0.0248	0.28%	0.0092	0.0061	66.30%	0.0040	0.0092	230.00%
mt-340	161	10.4694	0.0248	0.24%	0.0061	0.0061	100.00%	0.0028	0.0092	328.57%
mt-341	162	499.2008	0.0276	0.01%	0.0636	0.0093	14.62%	0.0566	0.0155	27.39%
mt-343	163	41.0674	0.0276	0.07%	0.0224	0.0093	41.52%	0.0243	0.0155	63.79%
mt-344	164	159.2771	0.0276	0.02%	0.0890	0.0093	10.45%	0.0319	0.0155	48.59%
mt-345	165	0.0183	0.0353	192.90%	0.0036	0.0055	152.78%	0.0541	0.0027	4.99%
mt-353	166	12.5069	0.0210	0.17%	0.0049	0.0063	128.57%	0.0035	0.0036	102.86%

5  
 [0372] Tal como se muestra en la Tabla 3, los péptidos lineales eran activos en el receptor GIP y, en muchos casos, el péptido fue adicionalmente activo en el receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1. Más específicamente, todos de mt-252, mt-255, mt-257, mt-260, mt-261, mt-262, mt-265, mt-266, mt-267, mt-275, mt-276, mt-277, mt-278, mt-279, mt-280, mt-286, mt-287, mt-288, mt-289, mt-290, mt-291, mt-292, mt-293, mt-295, mt-296, mt-297, mt-299, mt-306, mt-307, mt-310, mt-323, mt-324 y mt-345 mostraron actividad en los receptores de GIP, GLP-1, y glucagón, mientras que los otros péptidos de la Tabla 3 mostraron actividad en los receptores de GIP y GLP-1 (excepto para mt-285, que mostró actividad en sólo el receptor de GIP, y mt-325, que exhibió actividad en los receptores de glucagón y GIP, pero no en el receptor de GLP-1).

15 [0373] Al comparar los datos de mt-252, que comprendía una extensión C-terminal, con los datos del mt-257, mt-258, y mt-259, cuyos péptidos no comprendían una extensión C-terminal, era evidente que la extensión C-terminal mejoró las actividades de todos los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP.

20 [0374] Al comparar los datos de mt-252, que comprendía una Lys en la posición 16, con los datos de mt-275 y mt-276, cuyos péptidos comprendían un Orn y un residuo de Dab en la posición 16, respectivamente, era evidente que la Lys podría ser reemplazado por un residuo similar a Lys.

25 [0375] Además, al comparar los datos de mt-252, que comprende una Gln en la posición 3, con los datos de mt-256 y mt-274, cuyos péptidos comprenden una Glu en la posición 3, es evidente que la sustitución de Gln en la posición 3 por un residuo de Glu se logró una selectividad por los receptores de GLP-1 y GIP sobre el receptor de glucagón.

30 [0376] El efecto de la acilación con ácidos grasos C14, C16, y C18 era evidente a partir de los datos de mt-260 a mt-263 y mt-265 a mt-272. A partir de estos datos, fue evidente que la acilación con ácidos grasos C16 y C18 proporcionaba un aumento de la actividad en los receptores GLP-1 y GIP. La acilación de estos péptidos incluso permitió una mayor actividad en el receptor de glucagón a pesar de que los péptidos comprendían una sustitución Gln3Glu. El aumento de la actividad en el receptor de glucagón también podría ser observada a partir de los datos de los triagonistas mt-277 a mt-280.

#### EJEMPLO 26

35 [0377] Las actividades in vivo de un péptido cíclico que contiene lactama, pegilado, mt-178 (SEQ ID NO: 75), y un péptido lineal pegilado, que carecen de una lactama, mt-274 (SEQ ID NO: 99), fueron probados en ratones DIO, y se compararon con la actividad in vivo de un control de agonista de GLP-1 puro que tenía una estructura basada en GLP-1 de la SEQ ID NO: 179. Los péptidos o un control de vehículo se inyectaron intraperitonealmente en los ratones en el día 0 a 1, 3, o 10 nmol/kg/semana.

40 [0378] Se realizó una prueba de tolerancia de glucosa de 1-hora (GTT) en los ratones por vía intraperitoneal mediante la inyección de una solución salina con glucosa al 25% (p/v) en los ratones una hora después de la inyección con uno de los péptidos o control del vehículo. La solución salina de glucosa se administró a los ratones a una dosis de 1,5 g por kg de peso corporal del ratón. Los niveles de glucemia se midieron en el momento de la inyección de péptido o control del vehículo (-60 min), en el momento de la inyección de solución salina de glucosa en solución (0 min), o a los 15, 30, 60, o 120 min después de la inyección con la solución salina con glucosa. Los resultados de la GTT 1-hora se muestran en la Figura 7.

45 [0379] También se realizó un GTT de 24-horas en los ratones de la misma manera como el GTT de 1 hora, excepto que la solución salina de glucosa se administró a los ratones 24 horas después de la inyección con el péptido o vehículo control. Los resultados de la GTT 24 horas se muestran en la Figura 8.

50 [0380] Los niveles totales de glucosa en sangre de cada ratón 0 y 7 días después de la inyección con el péptido o vehículo control se muestran en la Figura 9.

55 [0381] Además, se midió el peso corporal de cada ratón a los 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la inyección con el péptido o control del vehículo. El % de cambio en el peso corporal de los ratones se muestran en la Figura 10.

60 [0382] Como se muestra en la Figura 10, los ratones inyectados con mt-178 y mt-274 ya sea a 3 o 10 nmol/kg/semana de dosis perdieron peso a la misma o mayor grado que los ratones inyectados con el péptido de control agonista de GLP (a 10 nmol/kg/semana de dosis).

65 [0383] Como se muestra en las figuras 7 y 8, los ratones inyectados con mt-178, mt-274, o el control de agonista de GLP-1 mostraron una disminución de los niveles de glucosa en la sangre, en comparación con los ratones inyectados con el control del vehículo. La potencia de mt-178 y mt-274 parece ser mayor que la del péptido de

control de agonista de GLP-1, ya que mt-178 y mt-274 a 3 nmol/kg/semana lograron el mismo efecto del control de péptido agonista de GLP-1 a 10 nmol/kg/semana de dosis. mt-274 parecía tener la potencia más alta, ya que este péptido a un 1 nmol/kg/semana dedosis logró resultados similares al péptido de control de agonista de GLP-1 a 10 nmol/kg/semana.

5

## EJEMPLO 27

[0384] Los mismos péptidos descritos en el Ejemplo 26 se ensayaron de nuevo en ratones, excepto que las dosis más altas (ya sea 10 o 35 nmol/kg/semana) de los péptidos se inyectaron por vía subcutánea en los ratones. Dos péptidos adicionales se ensayaron también a estas dosis: un péptido que tiene la misma estructura que mt-178 pero que comprende un grupo PEG unido a la Cys en la posición 40 a través de un enlace tioéter más estable (-SCH<sub>2</sub>CO-) formado por sustitución nucleófila en lugar de un enlace tioéter tradicional formado por malenimida PEG a través de la adición de Michael tal como se encuentra en mt-178) y un segundo péptido que tiene la misma estructura que mt-274 pero que comprende un grupo PEG unido a la Cys en la posición 40 a través del enlace de tioéter (-SCH<sub>2</sub>CO-) formado por sustitución nucleófila. Estos péptidos se denominan en este documento mt-178 (TE) y mt-274 (TE), respectivamente.

10

15

[0385] Se midieron los niveles totales de glucosa en sangre de los ratones 0 y 7 días después de la inyección con el péptido o vehículo control y se muestran en la Figura 11. Los cambios totales en la glucosa en sangre de los ratones se midieron 7 días después de la inyección con el péptido o vehículo control y se muestran en la Figura 12.

20

[0386] El peso corporal de cada ratón se midió a 0, 1, 3, 5, 7, y 10 días después de la inyección con el péptido o control del vehículo. El % de cambio en el peso corporal de los ratones en función del tiempo se muestra en la figura 13, mientras que el cambio total en el peso corporal de los ratones, medido 7 días después de la inyección con el péptido o el control del vehículo se muestra en la Figura 14.

25

[0387] Como se muestra en la figura 12, el cambio total en la glucosa en sangre disminuyó en todos los ratones inyectados con cualquiera de los péptidos ensayados, en comparación con los ratones inyectados con el control del vehículo. Los cambios más drásticos en la glucosa en sangre se observaron en los ratones inyectados con 35 nmol/kg/semana de mt-274 o mt-178 (TE).

30

[0388] Como se muestra en la figura 14, el cambio total en el peso corporal disminuyó en todos los ratones inyectados con cualquiera de los péptidos ensayados, en comparación con los ratones inyectados con el control del vehículo. Al igual que en el cambio total de la glucosa en sangre, se observaron los cambios más drásticos en el peso corporal en ratones inyectados con 35 nmol/kg/semana de mt-274 o mt-178 (TE).

35

## EJEMPLO 28

[0389] Las actividades in vivo de los péptidos descritos en el Ejemplo 26 se compararon con las actividades in vivo de versiones aciladas del péptido lineal mt-274. Más específicamente, se hicieron y probaron tres versiones aciladas de mt-274 en el que el aminoácido C-terminal (un residuo Lys) se une covalentemente a un grupo acilo graso C16, un grupo acilo graso C14, o un grupo acilo graso C18. Estos péptidos se denominan en este documento mt-298, mt-309, y mt-310, respectivamente. Al igual que el péptido parental, mt-274, los péptidos acilados también comprendían un grupo de 40 kDa PEG. Sin embargo, el grupo PEG de los péptidos acilados se une covalentemente a la cadena lateral de un residuo de Cys en la posición 24 de los péptidos. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos acilados mt-298, mt-309, y mt-310 se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NOs: 101 a 103, respectivamente.

40

45

[0390] Se realizó y probó una versión no acilada de mt-298, mt-209 y mt-310 (en lo sucesivo, mt-311). El péptido mt-311 difería de mt-274 en que mt-311 se une covalentemente a un grupo PEG a través de la cadena lateral de un residuo de Cys en la posición 24 (en oposición a un residuo Cys en el extremo C-terminal como se encuentra en mt-274) y el residuo C-terminal de mt-311 era un residuo Lys, no un residuo Cys, como se encuentra en mt-274.

50

[0391] Los péptidos o un control de vehículo se inyectaron subcutáneamente en ratones DIO en el Día 0 a 10 nmol/kg durante una semana.

55

[0392] Se midieron los niveles de glucosa en la sangre de los ratones los 0 y 7 días después de la inyección con el péptido o control de vehículo y se muestran en la Figura 15. El peso corporal de cada ratón se midió a 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la inyección con el péptido o control del vehículo. El % de cambio en el peso corporal de los ratones en función del tiempo se muestra en la figura 16, mientras que los cambios totales en el peso corporal de los ratones, medidos 7 días después de la inyección con el péptido o el control del vehículo se muestran en la Figura 17.

60

[0393] Como se muestra en la Figura 17, los ratones inyectados con cualquiera de los péptidos mostraron una disminución en el peso corporal en comparación con los ratones inyectados con el control del vehículo. Los ratones inyectados con el péptido cíclico pegilado que contiene lactama (mt-178) demostró la mayor pérdida de peso corporal 7 días después de la inyección.

65

**[0394]** Como se muestra en la Figura 15, los niveles de glucosa en la sangre de los ratones inyectados con mt-178, mt-274, mt-311 o versiones aciladas con C14 o C16 de los mismos disminuyeron. La acilación con un grupo acilo graso C18 no pareció causar una disminución en los niveles de glucosa en la sangre, lo que sugiere que el tamaño del grupo acilo puede ser importante para los efectos de disminución de glucosa de los péptidos.

#### EJEMPLO 29

**[0395]** Se realizaron péptidos basados en glucagón lineal que carecían de una lactama que fueron acilados pero no pegilados como esencialmente se describe anteriormente. Específicamente, se realizaron mt-260 que comprende un grupo acilo graso C14 en el aminoácido C-terminal (SEQ ID NO: 104), mt-261 que comprende un grupo acilo graso C16 en el aminoácido C-terminal (SEQ ID NO: 105) y mt-262 que comprende un grupo acilo graso C18 en el aminoácido C-terminal (SEQ ID NO: 106). Las estructuras de cada uno de estos péptidos fueron similares a los de mt-298, mt-309, y mt-310, pero difieren en que mt-260, mt-261, y mt-262 comprenden un residuo Asn en lugar de un residuo de Cys pegilado en la posición 24.

**[0396]** Los péptidos, mt-260, mt-261, o mt-262, un péptido de control (liraglutide, un análogo de GLP-1 acilado), o un control de vehículo se inyectaron QD en ratones a una dosis de 25 o 125 nmol/kg durante 7 días.

**[0397]** Se midieron los niveles de glucosa en la sangre de los ratones los 0 y 7 días después de la inyección con el péptido o control de vehículo y se muestran en la Figura 18. El peso corporal de cada ratón se midió a 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la inyección con el péptido o control del vehículo. El % de cambio en el peso corporal de los ratones en función del tiempo se muestra en la figura 19, mientras que los cambios totales en el peso corporal de los ratones, medidos 7 días después de la inyección con el péptido o el control del vehículo se muestran en la la Figura 20.

**[0398]** Como se muestra en la Figura 18, los efectos que los péptidos lineales no pegilados, acilados (mt-260, mt-261 y mt-262) que tuvieron en los niveles de glucosa en sangre fueron dramáticos. A 25 nmol/kg, estos péptidos causaron una disminución del 50% en los niveles de glucosa en sangre, y en la dosis más alta, los péptidos causaron una disminución en los niveles de glucosa en sangre que fue mayor que el 50%.

**[0399]** Como se muestra en la Figura 19, cada uno de los péptidos lineales, no pegilados, acilados (ya sea en la dosis baja o alta) causó una disminución en el peso corporal, que era más potente que la disminución en el peso corporal conseguido por Liraglutide a la dosis baja. El peso corporal continuó disminuyendo en el transcurso de los 7 días del ensayo.

**[0400]** Estos resultados sugieren que los péptidos lineales a base de glucagón acilados, no pegilados, que son activos en los receptores de GIP y GLP-1, son capaces de disminuir drásticamente los niveles de glucosa en sangre y el peso corporal, lo que indica que estos péptidos se pueden usar para tratar trastornos metabólicos, incluyendo la diabetes, y para el tratamiento de la obesidad.

#### EJEMPLO 30

**[0401]** El péptido lineal mt-261 a base de glucagón (SEQ ID NO: 105) se ensayó a diferentes dosis en ratones DIO (8 por grupo; peso corporal medio inicial = 48 g). Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea una vez al día durante una semana con sólo el vehículo, liraglutide (30 nmol/kg de peso corporal) o mt-261 (0,3, 1, 3, 10 o 30 nmol/kg de peso corporal).

**[0402]** El peso corporal de los ratones se midió 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la primera inyección. Como se muestra en la Figura 21, la inyección con mt-261 o liraglutide causó pérdida de peso en los ratones. El péptido mt-261 exhibió una potencia más alta que liraglutide, ya que 3 nmol/kg de mt-261 logró esencialmente el mismo efecto que 30 nmol/kg de liraglutide (Figura 21).

**[0403]** La masa grasa de los ratones se midió 7 días después de la primera inyección mediante resonancia magnética nuclear. Como se muestra en la Figura 22, dosis crecientes de mt-261 generalmente se correlacionaban con la disminución de la masa grasa. La masa grasa de los ratones inyectados con 3 nmol/kg de mt-261 era aproximadamente la misma que la masa grasa de los ratones inyectados con 30 nmol/kg de liraglutide, demostrando la alta potencia de mt-261 en comparación con liraglutide.

**[0404]** Se midieron los niveles de glucosa en sangre de los ratones los 0 y 7 días después de la primera inyección. Como se muestra en la Figura 23, dosis tan bajas como 3 nmol/kg de mt-261 causaron una disminución significativa en los niveles de glucosa en sangre. En concordancia con los resultados de los ensayos de masa grasa y el peso corporal, la disminución de los niveles de glucosa en sangre de los ratones inyectados con 3 nmol/kg de mt-261 fue similar a la disminución de los niveles de glucosa en sangre de ratones inyectados con 30 nmol/kg de liraglutide, demostrando la mayor potencia de mt-261 en comparación con liraglutide.

**[0405]** En un experimento separado, la versión no acilada de mt-261, a saber, mt-263 (SEQ ID NO: 111) fue probada en nueve grupos de ratones C57Bl/6 (8 ratones por grupo) por sus efectos in vivo sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos, los niveles de glucosa en la sangre, y la masa grasa. Los ratones tenían 11 meses de edad y habían estado en una dieta diabotogénico durante 9 meses en el momento del estudio. El peso corporal medio de los ratones eran 57 g. Los ratones fueron inyectados por vía subcutánea diariamente con 3, 10, o 30 nmol/kg de mt-263 durante una semana. Los grupos de control recibieron un control de vehículo o exendina-4 a 10 o 30 nmol/kg/día.

**[0406]** Para evaluar los efectos in vivo sobre el peso corporal, se midieron el peso corporal de los ratones en el día 0, 1, 3, 5, y 7, en el que el Día 0 es el primer día de la inyección. Como se muestra en la Figura 24, la inyección de mt-263 en cualquiera de las tres dosis causó una disminución constante en el peso corporal durante el período de prueba de 7 días. El efecto sobre el peso corporal también pareció ser dependiente de la dosis ya que el cambio total en el peso corporal (se muestra en la Figura 25) se incrementó a dosis crecientes de péptido mt-263. Además, como se muestra en la Figura 25, los cambios totales en el peso corporal obtenidos por cualquiera de las tres dosis de mt-263 eran sustancialmente mayores que el cambio total en el peso corporal conseguido por inyección con exendina-4 (en cualquiera de las dosis).

**[0407]** También se determinaron los efectos in vivo sobre la ingesta de alimentos, la masa grasa y la glucosa en sangre. La ingesta total de alimentos y la masa grasa tal como se mide en el Día 7 de los ratones inyectados con mt-263 se redujeron en comparación con el control del vehículo y exendina-4. Además, los cambios totales en los niveles de glucosa en sangre (medidos en el día 7 en comparación con los niveles medidos en el día 0) de los ratones inyectados con mt-263 se redujeron significativamente en comparación con los ratones inyectados con el control del vehículo o exendina-4 (Figura 26). El péptido a una dosis de 10 nmol/kg parecía ser la dosis óptima, consiguiendo la mayor disminución en los niveles de glucosa en sangre (casi -80 mg/dL).

**[0408]** Los efectos in vivo sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos, y los niveles de glucosa en sangre del péptido mt-263 también se compararon con los de los péptidos mt-349 (SEQ ID NO: 262), mt-280, mt-356, y mt-357, y de un control del vehículo. Los ratones recibieron 30 nmol/kg/día de uno de los péptidos durante 1 semana. Todos los péptidos fueron eficaces en la reducción de peso corporal en ratones en comparación con el control del vehículo.

#### EJEMPLO 31

**[0409]** Los efectos in vivo de los péptidos basados en glucagón lineales, acilados, mt-277, mt-278, y mt-279 se probaron y se compararon con los de liraglutide. Se inyectaron ratones DIO (8 ratones por grupo; la media de peso corporal inicial = 51,4 g) por vía subcutánea diariamente durante 1 semana con un control del vehículo o 10 nmol/kg de liraglutide, mt-277, mt-278, o mt-279.

**[0410]** El peso corporal de los ratones se midió 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la primera inyección. Como se muestra en la Figura 27, la inyección con mt-277, mt-278, o mt-279 o causó una pérdida de peso significativa en los ratones. Todos estos péptidos mostraron además una potencia más alta que liraglutide.

**[0411]** Se midieron los niveles de glucosa en sangre de los ratones los 0 y 7 días después de la primera inyección. Como se muestra en la Figura 28, cada uno de mt-277, mt-278, y mt-279 causó una disminución significativa en los niveles de glucosa en sangre, cuya disminución fue mucho mayor que la observada en los ratones inyectados con liraglutide.

#### EJEMPLO 32

**[0412]** Se modificó un análogo a base de glucagón activo del receptor de GLP-1 para comprender una extensión C-terminal de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 95 y modificado adicionalmente para comprender una Lys en el extremo C-terminal de SEQ ID NO: 95. El residuo de Lys que se encuentra en la posición 40 del análogo se acila con un grupo acilo graso C14. Este análogo acilado se ensayó para determinar la actividad in vitro en los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP esencialmente como se describe en el Ejemplo 16. La actividad in vitro se comparó con la del análogo parental a base de glucagón activo del receptor de GLP-1 que carece la extensión C-terminal y acilación en la posición 40. El análogo acilado extendido por C-terminal mostró un aumento del 15% aproximadamente de actividad en el receptor GIP y un incremento aproximado del 52% en el receptor de glucagón. La actividad en el receptor de GLP-1 en realidad disminuyó cuando fue estimulado por el análogo acilado extendido por C-terminal. Sin embargo, la actividad era todavía mayor que el 100% de la actividad alcanzada por GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1.

#### EJEMPLO 33

**[0413]** Los péptidos análogos de glucagón acilados (cada uno de los cuales comprendían una amida en lugar del carboxilato C-terminal) se sintetizaron como esencialmente se describe anteriormente. Los péptidos mt-358, mt-367, mt-368, y mt-369 eran monómeros acilados, mientras que mt-354, mt-376 y mt-377 eran dímeros acilados, en el que cada dímero está compuesto por dos monómeros unidos a través de residuos Cys C-terminal. Los péptidos mt-367, mt-368, y mt-369 comprendían una dipéptido espaciador  $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu para los propósitos de unir el grupo acilo,

mientras que mt-358 se acila en ausencia de un espaciador. Los péptidos mt-225, mt-227 y mt-294 eran monómeros pegilado que formaban un puente de lactama entre el ácido glutámico en la posición 16 y la lisina en la posición 20. Los péptidos mt-225 y mt-227 comprendían un dipéptido espaciador con fines de unir el PEG, mientras que mt-294 se acila por medio de un tioéter producido por una reacción con un haloacetilo. Los péptidos mt-356 y mt-357 servían como péptidos de control no acilados, de los cuales mt-357 comprendía una Ile en la posición 7, pero mt-356 comprendía una Thr. Todos fueron probados para la actividad in vitro en el receptor de GIP, el receptor de GLP-1, y los receptores de glucagón como se describe esencialmente en el Ejemplo 16. La EC50 (nM) y la actividad relativa a la hormona nativa de cada péptido se muestran en la Tabla 4.

TABLA 4

Código	Posición de grupo acilo (espaciador)	SEQ ID NO:	Receptor de glucagón			Receptor de GLP-1			Receptor de GIP		
			EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-356	n/a	232	0.0869	0.1095	126.06%	0.0048	0.0108	224.02%	0.0530	0.0136	25.66%
mt-357	n/a	233	0.0420	0.1095	260.92%	1.2518	0.0108	0.86%	0.0066	0.0136	206.37%
Estructuras de monómeros acilados											
mt-358	40 (ninguno)	234	0.0087	0.1095	1266.00%	0.0830	0.0108	13.04%	0.0045	0.0136	305.62%
mt-368	40 (γ(E)E)	236	0.0069	0.0337	491.82%	0.0038	0.0157	418.93%	0.00097	0.0029	296.07%
mt-367	40 (γ(E)E)	235	0.8201	0.0337	4.11%	0.0039	0.0157	405.94%	0.0014	0.0029	202.82%
mt-369	10 (γ(E)E)	237	2.1893	0.0337	1.54%	0.0041	0.0157	385.05%	0.0014	0.0029	204.26%
Estructuras de dímeros acilados											
mt-354*	40† (ninguno)	231	2.6078	0.0378	1.45%	0.0088	0.0120	136.99%	0.0046	0.0042	91.65%
mt-376**	40† (ninguno)	238	13.4644	0.0772	0.57%	0.0106	0.0134	126.82%	0.0068	0.0042	62.63%
mt-377**	40† (ninguno)	239	3.9038	0.0772	1.98%	0.0076	0.0134	177.88%	0.0031	0.0042	138.11%
Monómeros lactamizados pegilados											
mt-225	(ninguno)	259	2.712	0.054	1.99%	0.098	0.029	29.59%	1.899	0.017	0.90%
Código	Posición de grupo acilo (espaciador)	SEQ ID NO:	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa	EC <sub>50</sub> , nM	Std.	actividad relativa
mt-227	ninguno	260	4.244	0.054	1.27%	0.080	0.029	36.25%	1.320	0.017	1.29%
mt-294	ninguno	261	229.996	0.0235	0.01%	0.0608	0.0077	12.66%	0.3727	0.0110	2.95%

\* indica una estructura de dímero unida a disulfuro, en que cada monómero de péptido está unido a través de un enlace disulfuro tal como se muestra en la estructura A

\*\* indica una estructura de dímero unida a PEG, en que cada monómero de péptido está unido a través de un PEG tal como se muestra en la estructura B

† cada monómero del dímero comprendía acilación en la posición 40 del monómero (en el que la posición 1 es el aminoácido N-terminal)



5

Dimero disulfuro

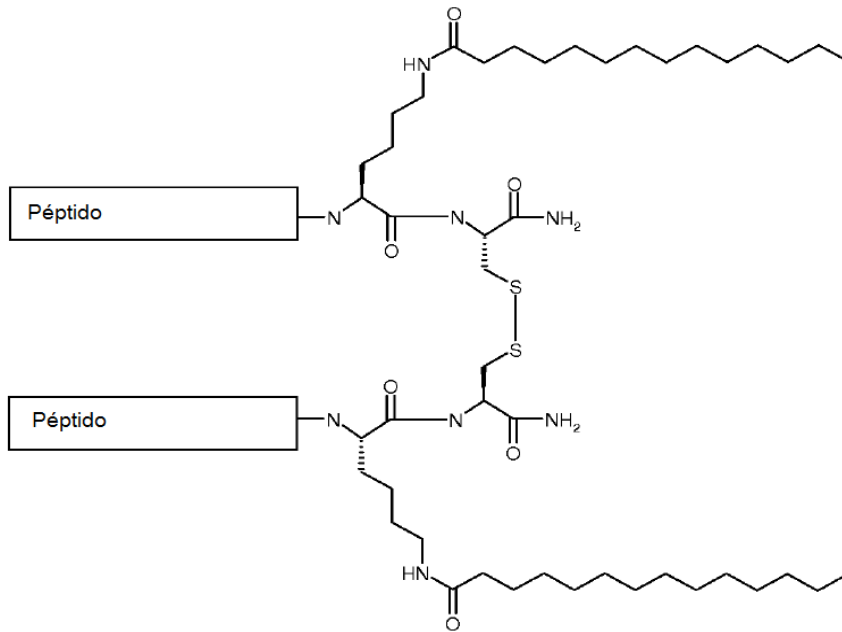
10

15

20

25

30



Estructura A

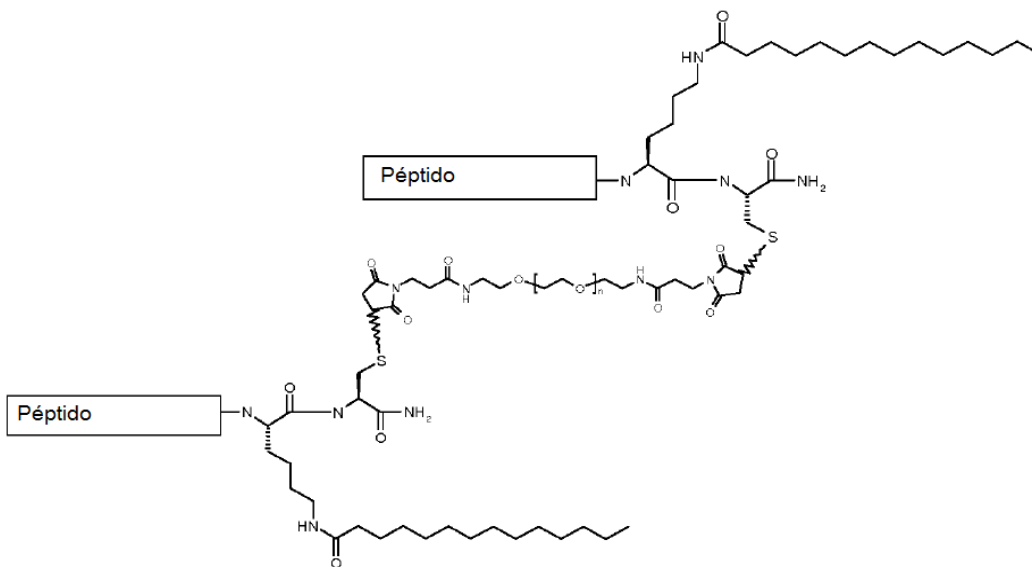
35

40

45

50

55



Estructura B

60

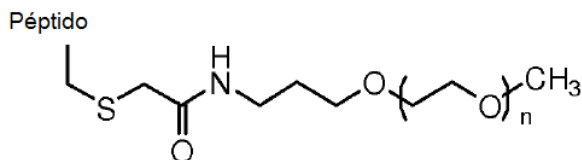
**[0414]** Como se muestra en la Tabla 4, los tres dímeros acilados mostraron una actividad potente en los receptores de GLP-1 y GIP. Además, la actividad en el receptor GLP-1 exhibida por mt-368 se mejoró drásticamente en comparación a la demostrada por mt-358, y la actividad en el receptor de GIP de mt-368 se mantuvo esencialmente en comparación con mt-358, lo que sugiere que la acilación de un péptido de glucagón a través de un espaciador puede aumentar la actividad en el receptor GLP-1, mientras se mantiene la actividad robusta en el receptor de GIP. La acilación a través de un espaciador en la posición 10 del análogo de glucagón parecía ser una posición tan buena

65

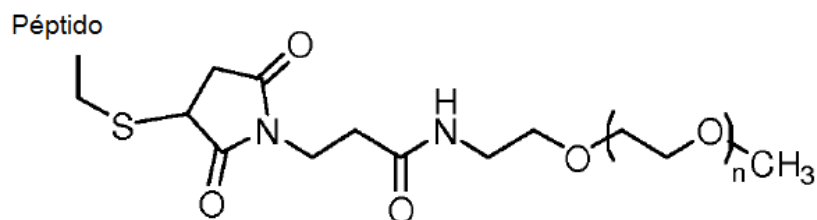
como la posición 40 del análogo de glucagón, ya que las actividades relativas en los receptores de GLP-1 y GIP fueron aproximadamente las mismas para mt-367 y mt-369.

## EJEMPLO 34

[0415] Se realizaron dos péptidos análogos de glucagón acilados que tienen la misma secuencia de aminoácidos pero que difieren en el enlazador pegilación como esencialmente se describe en el presente documento: mt-331 (SEQ ID NO: 153) comprendía una unión con PEG de la estructura:



mientras mt-311 (SEQ ID NO: 100) comprendía una unión con PEG de la estructura:



[0416] Los dos péptidos o un control de vehículo se administraron a través de inyección subcutánea QW durante una semana a varios grupos de ratones DIO (6 ratones por grupo; peso corporal medio = 64,6 g). Los péptidos se administraron a una dosis de 10 o 35 nmol/kg.

[0417] Los pesos corporales de los ratones se midieron 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la administración de los péptidos o el control del vehículo. El peso corporal de los ratones inyectados con la dosis más alta de cualquiera de mt-311 o mt-331 disminuyó de forma constante durante el transcurso de la semana. El cambio total en el peso corporal (%) se muestra en la figura 29. Como se muestra en esta figura, el cambio total en el peso corporal fue mayor para los ratones inyectados con mt-311.

[0418] La ingesta total de alimentos por cada grupo de ratones se midió también 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la administración de los péptidos o el control del vehículo. Como se muestra en la Figura 30, la ingesta total de alimentos por los grupos de ratones inyectados con cualquiera de las dosis de mt-311 o mt-331 se redujo en comparación con los ratones inyectados con un control del vehículo.

[0419] Se midieron los niveles de glucosa en sangre de cada grupo de ratones 0 y 7 días después de la administración de los péptidos o el control del vehículo. Los niveles de glucosa en sangre de los ratones disminuyeron tras la administración de la dosis más alta de cualquiera de mt-311 o mt-331. Como se muestra en la Figura 31, la disminución en los niveles de glucosa en sangre fue mayor en ratones inyectados con 35 nmol/kg de mt-331.

[0420] Se midió la masa grasa de cada grupo de ratones. La administración de los péptidos no parecía tener un efecto sobre la masa grasa, sin embargo.

## EJEMPLO 35

[0421] Los efectos in vivo de dos péptidos de la misma secuencia de aminoácidos pero que difieren por la ausencia de un grupo acilo unido a la Lys en la posición 40 (mt-331 (SEQ ID NO: 153)) o presencia de un grupo acilo graso C14 (mt-353 (SEQ ID NO: 166)) sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos, los niveles de glucosa en sangre y la masa grasa se ensayaron en ratones de C57Bl/6 de 7 meses de edad. Los ratones estaban en una dieta diabotogénico durante 5 meses y el peso corporal promedio inicial fue de 53 g. Los péptidos o un control de vehículo se administraron a los ratones por inyección subcutánea durante una semana a una dosis de 0,1, 0,3, 3, o 10 nmol/kg.

[0422] El peso corporal se midió 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la administración del péptido o vehículo control. Como se muestra en la figura 32, el cambio total en el peso corporal fue más significativo para los ratones inyectados con 10 nmol/kg de cualquiera de mt-331 o mt-353.

[0423] La ingesta de alimentos por los ratones se midió 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la administración del péptido o vehículo control. Como se muestra en la Figura 33, la ingesta total de alimentos por los ratones inyectados con 3 o 10 nmol/kg de cualquiera de mt-331 o mt-353 se redujo en comparación con ratones administrados con el control del vehículo.

[0424] Los niveles de glucosa en la sangre de los ratones también fueron monitorizados. Como se muestra en la Figura 34, mt-331 causó una disminución en los niveles de glucosa en sangre de una manera dependiente de la dosis. Las dos dosis de mt-353, además, causaron la disminución de los niveles de glucosa en sangre. Los niveles de masa grasa no se vieron afectados significativamente por la administración de cualquiera de los péptidos.

#### EJEMPLO 36

[0425] Los efectos in vivo de tres péptidos triagonistas acilados, mt-277, mt-278, y mt-279, que tienen la estructura de la SEQ ID NOs: 123, 124, y 125, respectivamente, sobre el peso corporal, niveles de glucosa en sangre y la ingesta de alimentos se pusieron a prueba en 8 grupos de ratones DIO (8 ratones por grupo). Los péptidos tenían la misma secuencia de aminoácidos pero diferían en el tamaño del grupo acilo graso al que se unen. Liraglutide a una concentración de 10 nM/kg fue utilizado como control. Los péptidos o un control de vehículo se administraron mediante inyección subcutánea diariamente durante una semana.

[0426] Se analizaron las actividades in vitro en los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP y el % de actividad de cada péptido con respecto a la hormona natural se muestran a continuación en la Tabla 5.

TABLA 5

Péptido	% de actividad en el receptor de GLP-1	% de actividad en el receptor de glucagón	% de actividad en el receptor de GIP
Liraglutide	138	0,04	n/d
Mt-277	224	235	446
Mt-278	460	588	846
Mt-279	420	733	527

[0427] El peso corporal de los ratones se midió 0, 1, 3, 5, y 7 días después de la administración de los péptidos o el control del vehículo. En el transcurso de la semana, el peso corporal de los ratones que fueron inyectados con uno de los péptidos triagonistas acilados disminuyó drásticamente, en comparación con el control del vehículo. Como se muestra en la figura 35, el cambio total en el peso corporal (%) de los ratones inyectados con uno de los péptidos triagonistas acilados fue de aproximadamente -15%, mientras que liraglutide logró menos de un 5% de disminución en el peso corporal.

#### EJEMPLO 37

[0428] El efecto de la frecuencia de dosificación en la eficacia de un péptido pegilado, acilado (mt-309; SEQ ID NO: 102) y un péptido acilado no pegilado (mt-261; SEQ ID NO: 105) se probó en 7 grupos de ratones DIO (8 ratones por grupo) que tienen un peso corporal promedio de 58 g. Los péptidos se inyectaron por vía subcutánea en los ratones QD a una dosis de 5 nmol/kg, cada dos días a una dosis de 10 nmol/kg, o QW a una dosis de 30 nmol/kg. El estudio duró 6 días, de manera que cada grupo de ratones recibió 30 nmol/kg al final del periodo de estudio. El peso corporal y los niveles de glucosa en sangre se midieron los 0 y 6 días después de la primera administración.

[0429] Como se muestra en la figura 36, el cambio total en el peso corporal (%) de los ratones inyectados QW con mt-309 era aproximadamente el mismo que el cambio total en el peso corporal para los ratones inyectados QD con el mismo péptido. También, como se muestra en la figura 36, el cambio total en el peso corporal de los ratones inyectados con QD mt-261 era casi el mismo que el cambio total en el peso corporal de los ratones inyectados cada dos días con este péptido.

[0430] Las mismas tendencias en el peso corporal pudo también observarse con los niveles de glucosa en sangre (Figura 37.): Una inyección de QW de mt-309 logró la misma disminución en los niveles de glucosa en sangre que una inyección QD de este péptido, y una inyección QD de mt-261 logró la misma disminución en los niveles de glucosa en sangre que una inyección cada 2 días de este péptido.

#### EJEMPLO 38

[0431] El efecto sobre la frecuencia de dosificación en la eficacia se probó para un péptido agonista de glucagón acilado, mt-261 (SEQ ID NO: 105) mediante inyección subcutánea de 8 grupos de ratones DIO (8 ratones por grupo) con un peso corporal inicial de 56 g con 5 nmol/kg al día, 10 nmol/kg cada 2 días, 15 nmol/kg cada 3 días, o 30 nmol/kg durante un día, de manera que cada grupo recibió una dosis total de 30 nmol/kg por semana. Los ratones

tenían 8 meses de edad y habían estado en una dieta diabotogénico durante 6 meses. Se midieron el peso corporal, la ingesta de alimentos, los niveles de glucosa en la sangre y la masa grasa de cada grupo. Como se muestra en la Figura 38, los ratones inyectados con el péptido cada tres días exhibió la mayor disminución en el peso corporal. Curiosamente, los ratones inyectados con el péptido diariamente y los ratones inyectados con el péptido cada dos días mostraron casi la misma disminución en el peso corporal.

## EJEMPLO 39

[0432] Los siguientes péptidos análogos de glucagón que tienen actividad agonista apreciable en sólo el receptor de glucagón y no el receptor de GIP y que comprenden una cadena principal del péptido J

HS-X-GTFTSDYSKYLDTRRAAEFVAWL(Nle)DE (SEQ ID NO: 240)

o el péptido K

HS-X-GTFTSDYSKYLD(Aibj)RRAADFVAWLMDE (SEQ ID NO: 241)

con modificación adicional en la posición 3 se realizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida como se describe esencialmente en el presente documento. Los péptidos se analizaron por la actividad in vitro en el receptor de glucagón como esencialmente se ha descrito en el Ejemplo 16. La EC<sub>50</sub> (nM) de cada péptido se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6

Cadena principal del péptido	Aminoácido en la posición 3	SEQ ID NO:	EC <sub>50</sub> en el receptor de glucagón (nM)	% de actividad*
J	Q	242	0,24	25%
J	C(Acm)	243	0,18	33%
J	Dab(Ac)	244	0,31	19%
J	Dap(urea)	245	0,48	13%
J	Q(Me)	246	0,48	13%
J	M(O)	247	0,91	7%
J	Orn(Ac)	248	0,92	7%
K	Q	249	0,39	15%
K	Dab(Ac)	250	0,07	86%
K	Q(Me)	251	0,11	55%

Q = glutamina; C(Acm) = acetamidometil-cisteína; Dab(Ac) = ácido acetildiaminobutanoico; Dap(urea) = ácido carbamoildiaminopropanoico; Q(Me) = metilglutamina; M(O) = metionina – sulfóxido; Orn(Ac) = acetilornitina

[0433] Como se muestra en la Tabla 6, múltiples aminoácidos podrían reemplazar la Gln en la posición 3 sin una pérdida sustancial de actividad en el receptor de glucagón, y, en algunos casos, la modificación de hecho aumentó la actividad, por ejemplo, Dab (Ac) y Q (Me) en la cadena principal del péptido K.

## EJEMPLO 40

[0434] Los péptidos análogos de glucagón que tienen actividad apreciable en el receptor de glucagón y no el receptor de GIP y que comprende Dab (Ac) en la posición 3 en varios esqueletos de análogos de glucagón se realizaron esencialmente como se describe en este documento y se probó la actividad in vitro en el receptor de glucagón. Las estructuras y actividades de cada péptido se muestran en la Tabla 7.

TABLA 7

Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO:	EC <sub>50</sub> en el receptor de glucagón (nM)	% de actividad*
Glucagón de tipo natural	1	0,026	100
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMDT	252	0,015	173
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAWLLDE	253	0,069	37
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRAADFVAWLLDTGPSSGAPPPS amida	254	0,023	113
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRASDFVSWLLDE	255	0,048	54
HSDab(Ac)GTFTSDYSKYLDAibRRATDFVTWLLDE	256	0,057	46

## EJEMPLO 41

[0435] Los análogos de glucagón que tienen una amida C-terminal en lugar del alfa carboxilato C-terminal se realizaron esencialmente como se describe en el presente documento: los péptidos mt-367, mt-368, y mt-369

comprendían las estructuras de SEQ ID NOs: 235, 236, y 237, respectivamente. El péptido mt-384 comprendía el aminoácido de SEQ ID NO: 1 con las siguientes modificaciones de aminoácidos: Tyr en la posición 1, un AIB en la posición 2, Lys en la posición 10, en el que la Lys se une covalentemente a un grupo acilo graso C16 a través un espaciador dipéptido  $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu, Ile en la posición 12, Lys en la posición 16, Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, AIB en la posición 20, Glu en la posición 21, Asn en la posición 24, Leu en la posición 27, Ala en la posición 28, y Gly en la posición 29, seguido por el aminoácido de SEQ ID NO: 95 C-terminal al aminoácido en la posición 29. El péptido mt-385 comprendía la misma estructura que el Péptido mt-384 excepto que Thr en la posición 7 se cambió a una Ile en mt-385.

[0436] Se analizaron los análogos por la actividad *in vitro* en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1, y GIP tal como esencialmente se describe en el presente documento. Los resultados se muestran en la Tabla 8.

TABLA 8

Péptido	% de actividad relativa en el receptor para		
	Glucagón	GLP-1	GIP
mt-367	4,11	405,94	202,82
mt-368	491,82	418,93	296,07
mt-369	1,54	385,05	204,26
mt-384	227,75	349,21	807,73
mt-385	239,45	3,18	714,88

[0437] Nueve grupos de 8 ratones DIO (cepa: C57B16 WT) fueron inyectados por vía subcutánea diariamente durante 7 días con 10 nmol/kg de uno de los péptidos de la Tabla 8. El peso corporal inicial promedio de los ratones fue 57,6 g. Los ratones tenían aproximadamente 10 meses de edad y habían estado con una dieta alta en grasas durante aproximadamente 8 meses.

[0438] Se midió el cambio total en el peso corporal en el día 7. Todos los ratones inyectados con un péptido de la Tabla 8 mostraron una disminución en el peso corporal en comparación con el control del vehículo. Los ratones que fueron inyectados con mt-369 mostraron la mayor cantidad de pérdida de peso (~ 25% de disminución), seguido por los ratones que fueron inyectados con mt-368 (~ 22% de disminución) y los ratones que fueron inyectados con mt-384 (~ 21 % disminución). Los ratones que fueron inyectados con mt-367 o mt-385 exhibieron una pérdida de peso menor, pero todavía significativa (mt-367: ~ 18% de disminución y mt-385: ~ 15% de disminución).

[0439] El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se debe interpretar que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "incluyendo", y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "incluyendo, pero no limitado a,") a menos que se indique lo contrario.

[0440] La mención de intervalos de valores en este documento no son más que la intención de servir como un método abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo y cada punto final, a menos que se indique lo contrario en este documento, y cada valor separado y punto final se incorpora en la memoria como si hubiera citado individualmente en el presente documento.

[0441] Todos los métodos descritos aquí se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquier y todos los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en este documento, pretende meramente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención salvo que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria debería interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

[0442] Las realizaciones preferidas de esta invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de estas realizaciones preferidas pueden llegar a ser evidentes para los expertos normales en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen dichas variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención pueda ser practicada de otra manera que la descrita específicamente en este documento. En consecuencia, esta invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia indicada en las reivindicaciones adjuntas según lo permitido por la ley aplicable. Por otra parte, cualquier combinación de los elementos descritos anteriormente en todas las variaciones posibles de los mismos está abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0443]

<110> Dimarchi, et al.  
 5 <120> Agonistas mixtos a base de GIP para el tratamiento de trastornos metabólicos y obesidad  
 <130> 31135/43978C  
 <160> 262  
 10 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 29  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <223> Glucagón de tipo salvaje  
 <400> 1  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 25 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 30 20 25  
 <210> 2  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 40 <222> (1)..(31)  
 <223> GLP-1(7-37)  
 <400> 2  
 45 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 Gly  
 50 20 25 30  
 <210> 3  
 <211> 30  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(30)  
 65 <223> GLP-1(7-36) amidada  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 558 842 T3

<222> (30)..(30)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 3  
 5 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg  
 20 25 30  
  
 <210> 4  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
  
 20 <220>  
 <221> mat\_peptide  
 <222> (1)..(42)  
 <223> polipéptido inhibidor gástrico  
  
 25 <400> 4  
 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 1 5 10 15  
 30 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
 20 25 30  
 35 Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln  
 35 40  
  
 <210> 5  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 61  
 50  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20.  
 55  
 <400> 5  
 60 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 65  
  
 <210> 6  
 <211> 29

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 62  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 15 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20.  
  
 <400> 6  
 20 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 25  
  
 <210> 7  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 63  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (12)..(16)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 12 y 16.  
  
 45 <400> 7  
  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 50 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
  
 55 <210> 8  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 65 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 66  
  
 <400> 8



ES 2 558 842 T3

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 5  
 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
 10 <210> 9  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 68  
 <400> 9  
 25 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 30 Ile His Gln Glu Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 35 <210> 10  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 69  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 55 <400> 10  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 60 Ile His Gln Glu Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 65 <210> 11  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 84  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 10  
 <400> 11  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
 <210> 12  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 85  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (20kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <400> 12  
 45  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 50  
 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
 55  
 <210> 13  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 65  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 92  
 <400> 13

ES 2 558 842 T3

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

5 Lys His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25

10 <210> 14  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 93

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(21)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 17 y 21

<400> 14

35 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

40 Lys His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25

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

50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 95

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

65 <400> 15

His Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Glu  
 1 5 10 15

65 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25

<210> 16  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 96  
  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 20 <400> 16  
 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 25 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
  
 30 <210> 17  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 97  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 <400> 17  
  
 50 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 55 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
  
 60 <210> 18  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 65  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<223> Análogo 98  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 18  
 10 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Glu  
 1 5 10 15  
 15 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
 <210> 19  
 <211> 42  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 99  
 30 <400> 19  
 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 35 1 5 10 15  
 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
 40 20 25 30  
 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
 45 35 40  
 <210> 20  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 100  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 60 <400> 20  
 65 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
20 25 30

5 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
35 40

10 <210> 21  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 101

<400> 21

25 Tyr Ala Pro Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
1 5 10 15

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
20 25 30

30 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
35 40

35 <210> 22  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Polipéptido sintético

45 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 102

50 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

<400> 22

55 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
1 5 10 15

60 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
20 25 30

65 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
35 40

<210> 23

<211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 104  
  
 <400> 23  
 15 Tyr Ala Pro Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 20 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
 20 25 30  
  
 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
 25 35 40  
  
 <210> 24  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 105  
 40  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido a cisteína  
 45 <400> 24  
  
 Tyr Ala Pro Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 1 5 10 15  
 50  
 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
 20 25 30  
  
 55 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
 35 40  
  
 <210> 25  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 60  
  
 <220>  
 65 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>

ES 2 558 842 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 106  
 <400> 25  
 5 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 1 5 10 15  
 10 Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20  
 <210> 26  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 20 <223> Polipéptido sintético  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 25 <223> Análogo 107  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 30 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 26  
 35 His Ser Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 40  
 <210> 27  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 108  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 60 <400> 27  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Lys Ala Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 65 Ile His Gln Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25



<210> 28  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 109  
  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 20 <400> 28  
  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 25 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
  
 30 <210> 29  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 110  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 <400> 29  
  
 50 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 55 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
  
 60 <210> 30  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 65  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<223> Análogo 111  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 30  
 10 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 15 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25  
 <210> 31  
 <211> 24  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 113  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es ácido 3-fenil láctico  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(15)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 11 y 15  
 40  
 <400> 31  
 Xaa Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Glu Ile His Gln Lys Asp  
 45 1 5 10 15  
 Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20  
 50  
 <210> 32  
 <211> 24  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 114  
 65  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es ácido 3-fenil láctico

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(15)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 11 y 15  
 5  
 <400> 32  
 Xaa Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu Ile His Gln Lys Asp  
 1 5 10 15  
 Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20  
 15  
 <210> 33  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 115  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 33  
 35  
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 40  
 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 45  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 50  
 <210> 34  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 116  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 65  
 <400> 34  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu

ES 2 558 842 T3

```

1              5              10              15

5  Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
    20      25      30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
    35

    <210> 35
    <211> 29
    <212> PRT
15  <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Polipéptido sintético

20

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <223> Análogo 118

25

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

30  <400> 35

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

35  Ile His Gln Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln
    20      25

40  <210> 36
    <211> 39
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

45  <220>
    <223> Polipéptido sintético

    <220>
50  <221> MISC_FEATURE
    <223> Análogo 120

    <220>
    <221> MISC_FEATURE
55  <222> (16)..(20)
    <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

    <400> 36

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

65  Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser
    20      25      30

    Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
  
```

35

5 <210> 37  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 124

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 37

25 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Glu  
 1 5 10 15

Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25

30

35 <210> 38  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 125

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

50 <400> 38

Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Glu  
 1 5 10 15

55 Ile His Gln Lys Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln  
 20 25

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

65 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 127

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

10 <400> 39  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

15 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

25 <210> 40  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 128

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 40

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

Ile His Gln Lys Asp Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

55 <210> 41  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 129

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 5  
 <400> 41  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 10  
 Ile His Gln Lys Asp Phe Ile Ala Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 20  
 <210> 42  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 139  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 42  
 40  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 45  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 50  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 55  
 <210> 43  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 140  
 65  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

ES 2 558 842 T3

<400> 43

5 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

15 <210> 44  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 141

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

35 <400> 44

40 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Met Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

50 <210> 45  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 142

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 45

Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Glu



ES 2 558 842 T3

1 5 10 15

5 Gln Ala Ala Lys<sub>20</sub> Glu Phe Val Asn Trp<sub>25</sub> Leu Leu Ala Gly Gly<sub>30</sub> Pro Ser

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

10

<210> 46  
<211> 39  
<212> PRT  
15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

20

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 143

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

30 <400> 46

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

35 Arg Arg Ala Lys<sub>20</sub> Glu Phe Val Asn Trp<sub>25</sub> Leu Leu Ala Gly Gly<sub>30</sub> Pro Ser

40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

<210> 47  
45 <211> 39  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Polipéptido sintético

<220>  
55 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 144

<220>  
60 <221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 47

65 Tyr Ala Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Met Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser

ES 2 558 842 T3

	20	25	30
5	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser		
	35		
	<210> 48		
	<211> 39		
10	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
15	<223> Polipéptido sintético		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
20	<223> Análogo 145		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
	<222> (16)..(20)		
25	<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20		
	<400> 48		
	Tyr Ala Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu		
30	1 5 10 15		
	Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser		
	20 25 30		
35	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser		
	35		
	<210> 49		
40	<211> 39		
	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
45	<220>		
	<223> Polipéptido sintético		
	<220>		
50	<221> MISC_FEATURE		
	<223> Análogo 146		
	<220>		
	<221> MISC_FEATURE		
55	<222> (16)..(20)		
	<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20		
	<400> 49		
60	Tyr Ala Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu		
	1 5 10 15		
	Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser		
65	20 25 30		
	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser		

35

5 <210> 50  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 147

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 50

25 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

35 <210> 51  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 148

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 51

55 Tyr Ser Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

60 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 52

ES 2 558 842 T3

<211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 149  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 <400> 52  
 20 Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 30  
  
 <210> 53  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 150  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 50 <400> 53  
  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 55 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
  
 65 <210> 54  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 151

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 54

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

20 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

25 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 55  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 152

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 55

55 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

60 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 56  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 558 842 T3

<220>  
<223> Polipéptido sintético

5  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 154

10  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa es ácido hipúrico

15  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

20 <400> 56  
Xaa Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15  
25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30  
30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35  
<210> 57  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

40  
<220>  
<223> Polipéptido sintético

45  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 155

50  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (12)..(16)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 12 y 16  
<400> 57  
Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15  
60 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30  
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

65  
<210> 58  
<211> 39  
<212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 156  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(24)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 20 y 24  
 15  
 <400> 58  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 20  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 25  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 30 <210> 59  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 157  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(28)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 24 y 28  
 <400> 59  
 50 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 55 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Lys Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 60 <210> 60  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 65 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 158

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 60

20 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

35 <210> 61  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 162

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

55 <400> 61

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

65 Gln Ala Val Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 62



<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 163  
  
 <220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 <400> 62  
 20 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 25 20 25  
  
 <210> 63  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 164  
 40  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 45  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 50  
  
 <400> 63  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 55 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 60 20 25  
  
 <210> 64  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 65  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 165  
 5  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 15  
 <400> 64  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 20  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 25  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 30  
 <210> 65  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 166  
 45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es d-alanina  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 65  
 55  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 60  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 65  
 <210> 66  
 <211> 39

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 167  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (17)..(20)  
 15 <223> Puente de lactama entre los residuos 17 y 20  
  
 <400> 66  
  
 20 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 Glu Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 25 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 30  
 <210> 67  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 168  
  
 <220>  
 45 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (18)..(21)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 18 y 21  
  
 <400> 67  
 50  
 Tyr Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 55 Gln Lys Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
  
 <210> 68  
 <211> 29  
 65 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>

<223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 169

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 68

20 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25

30 <210> 69  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 170

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

<400> 69

60 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

65 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

70 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

<210> 70  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 172  
  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
  
 30 <400> 70  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 35 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
  
 40 <210> 71  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 174  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 55 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 60 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 <400> 71  
  
 65 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
35 40

10 <210> 72  
<211> 39  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 175

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (24)..(24)  
<223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

<400> 72

40 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
35

50 <210> 73  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Polipéptido sintético

60 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 176

65 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 5  
 <400> 73  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 20 <210> 74  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 177  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 40  
 <400> 74  
 45 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 50 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 55 <210> 75  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 178  
 65  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)

<223> xaa es Aib  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <400> 75  
 15 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 20 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 25 35 40  
 <210> 76  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 179  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 55 <400> 76  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 60 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 65 <210> 77  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



<220>  
<223> Polipéptido sintético

5  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 182

10  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

15  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

20  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

25  
<400> 77  
Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

30  
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

35  
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
35 40

40  
<210> 78  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45  
<220>  
<223> Polipéptido sintético

50  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Análogo 186

55  
<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

60  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (16)..(20)  
<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

65  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (24)..(24)  
<223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
<400> 78

ES 2 558 842 T3

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

5 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Gly  
 20 25

10 <210> 79  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 191

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

<400> 79

30 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

35 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

40 <210> 80  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 192

55 <400> 80

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

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

65 Pro Ser

<210> 81

<211> 38  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 194  
  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <400> 81  
 20 Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu Glu  
 1 5 10 15  
  
 25 Ala Val Arg Leu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser Ser  
 20 25 30  
  
 30 Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
  
 35 <210> 82  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 197  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (13)..(17)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 13 y 17  
  
 50 <400> 82  
  
 Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu Gln Ala Ala  
 1 5 10 15  
  
 55 Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
  
 60 <210> 83  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 65 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 198

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(19)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 15 y 19

15 <400> 83  
 Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu Gln  
 1 5 10 15

20 Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25

25 <210> 84  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 199

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<400> 84

50 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

55 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

60

65 <210> 85  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 5 <223> Análogo 200

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 10 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 15 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 20 <223> Xaa es Nle

<400> 85  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 25 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Xaa Ala Gly Gly Pro Ser  
 30 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 35 40

<210> 86  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 201

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

<400> 86  
 55 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Glu Ala Val Arg Leu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 60 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 65 35

<210> 87

<211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 202  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <400> 87  
 30 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 35 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 45 <210> 88  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 203  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 5 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <400> 88  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 10 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Xaa Ala Gly Gly Pro Ser  
 15 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 20 <210> 89  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 204  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 <400> 89  
 45 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 50 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Arg Pro Ser  
 20 25 30  
 55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 60 <210> 90  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<223> Análogo 205  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
  
 <400> 90  
 20 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Arg Pro Ser  
 20 25 30  
  
 30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 35 40  
  
 <210> 91  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 206  
  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
  
 55 <400> 91  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 60 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Lys Gly Lys  
 20 25 30  
  
 65 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln Cys  
 35 40



<210> 92  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 207  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 25  
 <400> 92  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 30 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Lys Gly Lys  
 20 25 30  
 35 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln Cys  
 35 40  
 40  
 <210> 93  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Análogo 208  
 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 65  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (43)..(43)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <400> 93  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu

ES 2 558 842 T3

```

1           5           10           15
5  Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Lys Gly Lys
    20          25          30
10 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln Cys
    35          40
    <210> 94
    <211> 40
    <212> PRT
15 <213> Secuencia artificial
    <220>
    <223> Polipéptido sintético
20
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <223> Análogo 209
25
    <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (2)..(2)
    <223> Xaa es Aib
30
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (9)..(12)
    <223> Puente de lactama entre los residuos 9 y 12
35
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (16)..(20)
    <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20
40 <400> 94
    Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Glu Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu
    1           5           10          15
45 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
    20          25          30
50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys
    35          40
    <210> 95
55 <211> 10
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
    <220>
60 <223> Polipéptido sintético
    <220>
    <221> MISC_FEATURE
65 <223> CEX
    <400> 95

```

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

5 <210> 96  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es cualquier aminoácido

<400> 96  
 20 Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 1 5 10

25 <210> 97  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<400> 97

35 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala  
 1 5

40 <210> 98  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 45 <223> Polipéptido sintético

<400> 98

50 Lys Arg Asn Arg  
 1

<210> 99  
 <211> 40  
 55 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 60 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-274  
 65

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)

<223> Xaa es Aib  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 <220>  
 10 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 99  
 20 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35  
 <210> 100  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-311  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 65 <400> 100  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

5 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
                   20                                  25                                  30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
                   35                                  40

10 <210> 101  
       <211> 40  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

15 <220>  
       <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <223> mt-298

25 <220>  
       <221> MOD\_RES  
       <222> (2)..(2)  
       <223> Xaa es Aib

30 <220>  
       <221> MOD\_RES  
       <222> (20)..(20)  
       <223> Xaa es Aib

35 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (24)..(24)  
       <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

40 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (40)..(40)  
       <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina

45 <220>  
       <221> MISC\_FEATURE  
       <222> (40)..(40)  
       <223> Amidación C-terminal

50 <400> 101

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1                  5                                  10                                  15

55 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
                   20                                  25                                  30

60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
                   35                                  40

65 <210> 102  
       <211> 40  
       <212> PRT  
       <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mt-309

10 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

15 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa es Aib

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (24)..(24)  
<223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 102

35 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
1 5 10 15

40 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

50 <210> 103  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Polipéptido sintético

60 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

65 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa es Aib

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 5 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 10 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 103

20 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

35 <210> 104  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-260

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 104

65 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

10 <210> 105  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-261

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 105

45 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

60 <210> 106  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-262



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 10 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 15 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 20 <223> Amidación C-terminal

<400> 106

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 25 1 5 10 15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 30 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 35 40

<210> 107  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-252

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 107

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 65 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

10 <210> 108  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-255

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido a cisteína

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 108

45 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

60 <210> 109  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-256

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 10 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 109

20 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

30 <210> 110  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-257

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 110

60 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

65 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25

<210> 111  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-263  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 30  
 <400> 111  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 35 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 45  
 <210> 112  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-264  
 60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 65  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 <400> 112  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys

ES 2 558 842 T3

```

1           5           10           15

5  Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly
    20           25

<210> 113
<211> 39
10 <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

<220>
15 <223> Polipéptido sintético

<220>
20 <221> MISC_FEATURE
    <223> mt-265

<220>
25 <221> MOD_RES
    <222> (2)..(2)
    <223> Xaa es Aib

30 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (20)..(20)
    <223> Xaa es Aib

35 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (24)..(24)
    <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

40 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (39)..(39)
    <223> Amidación C-terminal

45 <400> 113

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys
1   5           10           15

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Lys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
    20           25           30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
    35

60 <210> 114
    <211> 39
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

65 <220>
    <223> Polipéptido sintético

<220>
70 <221> MISC_FEATURE
    <223> mt-266

<220>

```

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal  
 20 <400> 114  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Lys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 <210> 115  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-267  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 115

ES 2 558 842 T3

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

5 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Lys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

15 <210> 116  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-268

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 116

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

45 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Lys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

55 <210> 117  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-269

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal

20 <400> 117

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1                    5                    10                    15

25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
                   20                    25                    30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
                   35

35 <210> 118  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-270

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 118



ES 2 558 842 T3

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

5 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

15 <210> 119  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-271

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 119

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

60 <210> 120  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-272

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal

20 <400> 120

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1                    5                    10                    15

25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
                   20                    25                    30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
                   35

35 <210> 121  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-275

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Orn

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 121

ES 2 558 842 T3

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

5 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

15 <210> 122  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-276

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es ácido 2,4-diaminobutírico

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 122

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

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

60 <210> 123  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-277

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

25 <400> 123  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

30 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

40 <210> 124  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-278

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 124  
 5 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 <210> 125  
 <211> 40  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-279  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 50  
 <400> 125  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 55 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 65 <210> 126  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-280

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

25

<400> 126

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

30

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

35

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

40

<210> 127  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-281

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

65

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 558 842 T3

<222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 127  
 5 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
  
 <210> 128  
 15 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 25 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-282  
  
 <220>  
 30 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 35 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 <220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 45 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 128  
 50 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 55  
  
 <210> 129  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 65  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-283

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 10 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 15 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 20 <223> Amidación C-terminal

<400> 129  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 25 1 5 10 15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 30 20 25

<210> 130  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-284

45  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina

55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

60  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal

65 <400> 130  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15



Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 5  
 <210> 131  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-285  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
 35 <400> 131  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 40  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 45 <210> 132  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <220>  
 55 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-286  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 60 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 65 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

10

<400> 132  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

20

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

25

<210> 133  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

35

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-287

40

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina

55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

60

<400> 133  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

65

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

5 <210> 134  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-288  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 134  
  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 50 <210> 135  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-289  
  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 10 <400> 135  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 15 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 25 <210> 136  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-290  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 136  
 65 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser

ES 2 558 842 T3

		20		25		30	
5	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys						
		35		40			
	<210>	137					
	<211>	40					
10	<212>	PRT					
	<213>	Secuencia artificial					
	<220>						
15	<223>	Polipéptido sintético					
	<220>						
	<221>	MISC_FEATURE					
20	<223>	mt-291					
	<220>						
	<221>	MOD_RES					
	<222>	(2)..(2)					
25	<223>	Xaa es Aib					
	<220>						
	<221>	MOD_RES					
	<222>	(20)..(20)					
30	<223>	Xaa es Aib					
	<220>						
	<221>	MISC_FEATURE					
	<222>	(24)..(24)					
35	<223>	PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína					
	<220>						
	<221>	MISC_FEATURE					
	<222>	(40)..(40)					
40	<223>	grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina					
	<220>						
	<221>	MISC_FEATURE					
	<222>	(40)..(40)					
45	<223>	Amidación C-terminal					
	<400>	137					
50	Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys						
	1			5		10	15
	Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser						
		20		25		30	
55	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys						
		35		40			
60	<210>	138					
	<211>	40					
	<212>	PRT					
	<213>	Secuencia artificial					
65	<220>						
	<223>	Polipéptido sintético					

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-292

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

30 <400> 138  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

35 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

45 <210> 139  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-293

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 10 <400> 139  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 15 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 25 <210> 140  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-295  
  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 140  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 60 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

<210> 141  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-296  
  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 35 <400> 141  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 40 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 50  
 <210> 142  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 60 <223> mt-297  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 65 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES



<222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 15 <400> 142  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 20 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 25 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 30 <210> 143  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-299  
  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 143  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys

ES 2 558 842 T3

```

1           5           10           15
5  Gln Ala Ala xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser
   20                25                30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
    35                40

15 <210> 144
    <211> 40
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
    <223> Polipéptido sintético

20 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <223> mt-306

25 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (2)..(2)
    <223> Xaa es Aib

30 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (20)..(20)
    <223> Xaa es Aib

35 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (40)..(40)
    <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

40 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (40)..(40)
    <223> Amidación C-terminal

45 <400> 144
    Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys
    1           5           10           15

50 Gln Ala Ala xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
   20                25                30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
    35                40

60 <210> 145
    <211> 40
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial

    <220>
65 <223> Polipéptido sintético

    <220>

```

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-307  
  
 5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 18 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 145  
 25 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 30 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 <210> 146  
 <211> 40  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 45  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-308  
 50  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 55  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 60  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 65  
  
 <400> 146  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys

ES 2 558 842 T3

	1		5						10					15		
5	Gln	Ala	Ala	Xaa 20	Glu	Phe	Val	Cys	Trp 25	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly 30	Pro	Ser
10	Ser	Gly	Ala 35	Pro	Pro	Pro	Ser	Lys 40								
	<210>		147													
	<211>		40													
	<212>		PRT													
15	<213>		Secuencia artificial													
	<220>															
	<223>		Polipéptido sintético													
20	<220>															
	<221>		MISC_FEATURE													
	<223>		mt-322													
25	<220>															
	<221>		MOD_RES													
	<222>		(2)..(2)													
	<223>		Xaa es Aib													
30	<220>															
	<221>		MOD_RES													
	<222>		(20)..(20)													
	<223>		Xaa es Aib													
35	<220>															
	<221>		MISC_FEATURE													
	<222>		(40)..(40)													
	<223>		grupo acilo 3-SH-propiónico unido covalentemente a lisina													
40	<220>															
	<221>		MISC_FEATURE													
	<222>		(40)..(40)													
	<223>		Amidación C-terminal													
45	<400>		147													
	Tyr	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Tyr	Leu	Asp	Lys
	1				5					10					15	
50	Gln	Ala	Ala	Xaa 20	Glu	Phe	Val	Asn	Trp 25	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly 30	Pro	Ser
55	Ser	Gly	Ala 35	Pro	Pro	Pro	Ser	Lys 40								
60	<210>		148													
	<211>		40													
	<212>		PRT													
	<213>		Secuencia artificial													
	<220>															
65	<223>		Polipéptido sintético													
	<220>															

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-323  
  
 5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 8 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 148  
 25 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 30 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 <210> 149  
 <211> 40  
 40 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 45  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-324  
 50  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 55  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 60  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 65  
  
 <400> 149  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ser Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys

ES 2 558 842 T3

1 5 10 15

5 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
35 40

15 <210> 150  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> mt-325

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa es ácido 2-aminobutírico

35 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa es Aib

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> Amidación C-terminal

45 <400> 150

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

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
35 40

60 <210> 151  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
65 <223> Polipéptido sintético

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-329  
  
 5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 8 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 151  
 25 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 30 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 40 <210> 152  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-330  
  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 8 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)

<223> Amidación C-terminal  
 <400> 152  
 5 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 <210> 153  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-331  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 50 <400> 153  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 55 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 65 <210> 154  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-333

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Xaa es d-Lysine

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a d-lisina

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 154

35 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

40 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

50 <210> 155  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-334

65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)

<223> Xaa es Aib  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 5 <222> (40)..(40)  
 <223> Xaa es d-Lysine  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 155  
 15 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 20 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 25 35 40  
 <210> 156  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-335  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Xaa es d-Lysine  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 156

5 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 10 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 15 35 40

<210> 157  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-336

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Xaa es d-Lysine

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 157

55 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

60 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

<210> 158

<211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-337  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 158  
 35 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 40 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 45  
 50 <210> 159  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-338  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 5 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 159  
  
 10 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 15 20 25 30  
  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 20 35  
  
 <210> 160  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-339  
  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 160  
 55 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 60 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys  
 65 35 40  
  
 <210> 161

<211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-340  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 161  
 30 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 35 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys  
 35 40  
 45 <210> 162  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-341  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 5 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 10 <223> Amidación C-terminal

<400> 162

15 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

20 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

25 <210> 163  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-343

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 163

65 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys  
 35 40

10 <210> 164  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-344

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 164

45 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys  
 35 40

60 <210> 165  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-345



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 10 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 165

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

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

35 <210> 166  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-353

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 Carbonos unido covalentemente a lisina

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

ES 2 558 842 T3

<400> 166

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

5

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

15

<210> 167  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-241

30

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 167

45

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

50

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

60

<210> 168  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-242

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 5 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 10 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 15 <223> Amidación C-terminal

<400> 168

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

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

25 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

30 <210> 169  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-273

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (12)..(16)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 12 y 16

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 169

65 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

10 <210> 170  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 <400> 170

20 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Lys  
 1 5 10

25 <210> 171  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Gly or a small, aliphatic or non-polar or slightly polar  
 amino acid

40 <400> 171  
 Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Lys  
 1 5 10

45 <210> 172  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> Xaa es Gly o un aminoácido pequeño, alifático, no polar o ligeramente  
 polar

60 <400> 172  
 Xaa Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 1 5 10

65 <210> 173  
 <211> 40  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Synthetic polypeptide  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-248  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 30  
 <400> 173  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 35  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 40  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
 45 <210> 174  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-249  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

10 <400> 174  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

15 Gln Ala Ala Gln Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

25 <210> 175  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-250

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 175

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

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40

5 <210> 176  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-251  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 176  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 35 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
 35 40  
  
 45 <210> 177  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-258  
  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>

ES 2 558 842 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
 5 <400> 177  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 15 <210> 178  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-259  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Amidación C-terminal  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 <400> 178  
 45 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
 55 <210> 179  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequene  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)



<223> PEG (40kDa) unido covalentemente a cisteína  
 <400> 179

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

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

<210> 180  
 <211> 42  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 24

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

30

<400> 180

Tyr Ala Pro Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys  
 1 5 10 15

35

Ile His Gln Gln Asp Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys  
 20 25 30

40

Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln  
 35 40

45 <210> 181  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 69

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

65

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 5 <400> 181  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 20 <210> 182  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 70  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 50 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa cpuede ser cualquier aminoácido natural  
 <400> 182  
 55 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 60 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Xaa  
 20 25  
 65 <210> 183  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 72

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

<400> 183

25 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

30 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

40 <210> 184  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 75

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

65 <400> 184

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

10 <210> 185  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> sythetic polypeptide

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 76

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 <400> 185

40 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

45 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25

50 <210> 186  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 77

65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)

<223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

<400> 186

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

15 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

<210> 187  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 78

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

50 <400> 187

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

55 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Gly  
 20 25

60 <210> 188  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 87

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

20 <400> 188

Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Val Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1                    5                    10                    15

25 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
                   20                    25                    30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
                   35                    40

35 <210> 189  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 88

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

<400> 189

ES 2 558 842 T3

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

5 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Xaa Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

15 <210> 190  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 90

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

<400> 190

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

45 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Arg Pro Ser  
 20 25 30

50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

55 <210> 191  
 <211> 43  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 93

<220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama entre los residuos 16 y 20

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (43)..(43)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

15 <400> 191  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

20 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Lys Gly Lys  
 20 25 30

25 Lys Asn Trp Leu Lys His Asn Ile Thr Gln Xaa  
 35 40

30 <210> 192  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 99

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 192

65 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser



	20	25	30
5	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa 35 40		
10	<210> 193 <211> 40 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Polipéptido sintético		
20	<220> <221> MISC_FEATURE <223> SEQ ID NO: 100		
25	<220> <221> MOD_RES <222> (2)..(2) <223> Xaa es Aib		
30	<220> <221> MOD_RES <222> (20)..(20) <223> Xaa es Aib		
35	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (24)..(24) <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo		
40	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (40)..(40) <223> Amidación C-terminal		
45	<400> 193  Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys 1 5 10 15		
50	Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser 20 25 30		
55	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys 35 40  <210> 194 <211> 40 <212> PRT <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Polipéptido sintético		
65	<220> <221> MISC_FEATURE <223> SEQ ID NO: 101, 102, 103  <220>		

<221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 25 <400> 194  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 30 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 40 <210> 195  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 104, 105, 106  
 55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

<222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 195  
 5 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
  
 <210> 196  
 <211> 40  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 108  
 30  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 35  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 45  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 50  
 <400> 196  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 55 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
  
 65 <210> 197  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 113, 114, 115

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

20

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo

25

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal

30

<400> 197  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

35

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

40

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

45

<210> 198  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 117, 118, 119

60

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

65

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo

<220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 10 <400> 198  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 15 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
  
 25 <210> 199  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 123, 124, 125  
  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 60 <400> 199  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 65 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

<210> 200  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 127  
  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 35 <400> 200  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 40 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
  
 45 <210> 201  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 128, 129, 130  
  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal

10 <400> 201  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

15 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25

20 <210> 202  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 132

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 202

55 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

60 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

65 <210> 203  
 <211> 40

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 136, 137, 138  
  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 203  
  
 40 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 45  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 50  
 <210> 204  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 139  
  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib



<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 15

<400> 204  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 20

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 25

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 30

<210> 205  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35

<220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 140  
 45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 55

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 60

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 205  
 65

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
35 40

10 <210> 206  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> SEQ ID NO: 141

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa es Aib

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo

40 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 206

45 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
1 5 10 15

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
35 40

55 <210> 207  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Polipéptido sintético

65 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> SEQ ID NO: 142

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 5

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 20

<400> 207  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 25

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 35

<210> 208  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40

<220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 45

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 143  
 50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 60

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 65

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 5 <400> 208  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 20 <210> 209  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 144, 145  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 209  
 55 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 60 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 65 <210> 210  
 <211> 40  
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 148  
 10  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 15  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 25  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 30  
 <400> 210  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 35  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 40  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 45  
 <210> 211  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 55  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 152  
 60  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 65  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 10 <400> 211  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 15 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 20 25 30  
 20 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 25 <210> 212  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 152  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 212  
 60 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

5 <210> 213  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 153  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 213  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
  
 50 <210> 214  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 154  
  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>

ES 2 558 842 T3

<221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 15 <400> 214  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 20 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 25 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 30 <210> 215  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 35 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 156  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 215



ES 2 558 842 T3

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

5 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

15 <210> 216  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 157

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 216

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

50 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

60 <210> 217  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

65 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 558 842 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 235

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo

15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

25 <400> 217  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

30 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

40 <210> 218  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 160

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 558 842 T3

<222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 218  
 5 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa Cys  
 35 40  
  
 <210> 219  
 <211> 39  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 25  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 162  
 30  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 35  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 40  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 45  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 50  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal  
 55  
  
 <400> 219  
  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 60  
  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 65  
  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

<210> 220  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 163  
  
 15 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 40 <400> 220  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 45 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa Xaa  
 35 40  
  
 55 <210> 221  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 65 <223> SEQ ID NO: 164  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES

<222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 20 <400> 221  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
  
 30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Xaa  
 35 40  
  
 35 <210> 222  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 165  
  
 50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
  
 60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 65 <400> 222  
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Cys Trp Leu Met Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 5  
 <210> 223  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 166  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 25  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 30  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo  
 35  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo  
 40  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 45 <400> 223  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 50  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 55 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40  
 60  
 <210> 224  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 65 <223> synethic polypeptide  
 <220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 173

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

10 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

25 <400> 224  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

30 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

35 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

40 <210> 225  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> SEQ ID NO: 174

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)

<223> Amidación C-terminal  
 <400> 225

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

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

15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa  
 35 40

<210> 226  
 <211> 30  
 <212> PRT  
 20 <213> Artificial Sequene

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Aminoácido sustituido unido covalentemente a grupo hidrófilo

35 <400> 226

40 His Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

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

45 <210> 227  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

50 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal



ES 2 558 842 T3

<400> 227

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

10 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly  
20 25

<210> 228  
<211> 29  
<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es D-Ser, DAla, Val, Gly, N-Methyl Ser, N-Metil Ala, or Aib

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (16)..(16)  
<223> Xaa es Lys, Glu, Ser, Orn, Dab, Aib o cualquier aminoácido alfa,  
30 alfa-disustituido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
35 <223> Xaa es cualquier aminoácido alfa, alfa-disustituido

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (27)..(27)  
40 <223> Xaa es Ile, Leu, o Nle

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (28)..(28)  
45 <223> Xaa es Ala o Gly

<220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (29)..(29)  
50 <223> Xaa es Thr, Ala, o Gly

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (29)..(29)  
55 <223> Amidación C-terminal

<400> 228

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

65 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Xaa Xaa Xaa  
20 25

<210> 229  
<211> 29

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 20 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 229  
  
 25 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
  
 30 Arg Arg Ala Xaa Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Ala Gly  
 20 25  
  
 <210> 230  
 <211> 29  
 35 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 40  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 45 <223> Xaa es D-Ser, DAla, Val, Gly, N-Metil Ser, N-Metil Ala, o Aib  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 50 <223> Xaa es Lys, Glu, Ser, Orn, Dab, Aib o cualquier aminoácido alfa,  
 alfa-disustituido  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 55 <223> Xaa es cualquier aminoácido alfa, alfa-disustituido  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 60 <223> Xaa es Ile, Leu, o Nle  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (28)..(28)  
 65 <223> Xaa es Ala o Gly  
  
 <220>

<221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Xaa es Thr, Ala, o Gly

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal

10 <400> 230  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15

15 Arg Arg Ala Xaa Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa  
 20

20 <210> 231  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Mt-354

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Homodímero

40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 carbonos unido covalentemente a lisina

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

60 <220>  
 <221> DISULFID  
 <222> (41)..(41)  
 <223> enlace disulfuro formado con residuo de Cys de un segundo péptido que  
 tiene la misma estructura.

<400> 231

65 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

ES 2 558 842 T3

Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

5 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys  
35 40

10 <210> 232  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Polipéptido sintético

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Mt-356

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

30 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (20)..(20)  
<223> Xaa es Aib

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (40)..(40)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 232

40 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
1 5 10 15

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

45

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

50 <210> 233  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

55 <220>  
<223> Polipéptido sintético

60 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> Mt-357

65 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 10  
 <400> 233  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 25 <210> 234  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 30 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Mt-358  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 carbonos unido covalentemente a lisina  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal  
 <400> 234  
 60 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 65 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys

35 40

5 <210> 235  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Mt-367

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 16 carbonos unido covalentemente a lisina a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 235

40 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

45 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

50 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

55 <210> 236  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

60 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Mt-368

65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 5 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 10 <223> grupo acilo graso de 16 carbonos unido covalentemente a lisina a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

<400> 236

20 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15

25 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

30 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

<210> 237  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 35 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Mt-369

45 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> grupo acilo graso de 16 carbonos unido covalentemente a lisina a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Amidación C-terminal

65 <400> 237

Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Ile Tyr Leu Asp Lys

ES 2 558 842 T3

```

1             5             10             15
5  Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
   20          25          30
10 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys
    35          40
15 <210> 238
    <211> 41
    <212> PRT
    <213> Secuencia artificial
    <220>
    <223> Polipéptido sintético
20 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <223> Mt-376
25 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <223> Homodimer
30 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (2)..(2)
    <223> Xaa es Aib
35 <220>
    <221> MOD_RES
    <222> (20)..(20)
    <223> Xaa es Aib
40 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (40)..(40)
    <223> grupo acilo graso de 14 carbonos unido covalentemente a lisina
45 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (41)..(41)
    <223> Amidación C-terminal
50 <220>
    <221> MISC_FEATURE
    <222> (41)..(41)
    <223> residuo de Cys unido covalentemente a PEG 20 kDa que a su vez está
        unido covalentemente a un residuo de Cys de un segundo péptido que tiene la
        misma estructura
55 <400> 238
    Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys
    1          5          10          15
60 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser
   20          25          30
65 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys
    35          40

```



<210> 239  
 <211> 41  
 <212> PRT  
 5 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Mt-377  
  
 15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> homodimer  
  
 20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (40)..(40)  
 <223> grupo acilo graso de 14 carbonos unido covalentemente a lisina  
  
 35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> PEG (5kDa) unido covalentemente a cisteína  
  
 40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (41)..(41)  
 <223> residuo de Cys unido covalentemente a PEG 5 kDa que a su vez está  
 unido covalentemente a un residuo de Cys de un segundo péptido que tiene la  
 misma estructura  
 50 <400> 239  
  
 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Lys  
 1 5 10 15  
 55  
 Gln Ala Ala Xaa Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 60  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys Cys  
 35 40  
  
 65 <210> 240  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Peptido J

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es un análogo de Glutamina

15

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

20

<400> 240

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

25

Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 20 25

30

<210> 241  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

40

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Peptide K

45

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es un análogo de Glutamina

50

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib

<400> 241

55

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

60

Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu  
 20 25

65

<210> 242  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

<400> 242

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

15 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 20 25

20 <210> 243  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Acetamidometil-cisteína

35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

<400> 243

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

45 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 20 25

50 <210> 244  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido sintético

60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es ácido Acetildiaminobutanoico

65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

<400> 244

ES 2 558 842 T3

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

5 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 20 25

10 <210> 245  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es ácido carbamoildiaminopropanoico

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

<400> 245

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

35 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 20 25

40 <210> 246  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Polipéptido sintético

50 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Metilglutamina

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle

<400> 246

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

65 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 20 25

<210> 247  
 <211> 29

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 10 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es sulfóxido de Metionina  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 15 <222> (27)..(27)  
 <223> Xaa es Nle  
  
 <400> 247  
 20 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr  
 1 5 10 15  
  
 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 25 20 25  
  
 <210> 248  
 <211> 29  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> synthetic peptide  
 35  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 40 <223> Xaa es Acetilornitina  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 45 <223> Xaa es Nle  
  
 <400> 248  
 50 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Thr  
 1 5 10 15  
  
 Arg Arg Ala Ala Glu Phe Val Ala Trp Leu Xaa Asp Glu  
 55 20 25  
  
 <210> 249  
 <211> 29  
 60 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 65  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)

<223> Xaa es Aib  
 <400> 249  
 5 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu  
 10 20 25  
 <210> 250  
 <211> 29  
 15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 25 <223> Xaa es ácido Acetildiaminobutanoico  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 30 <223> Xaa es Aib  
 <400> 250  
 35 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu  
 40 20 25  
 <210> 251  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 45 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 50  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Metilglutamina  
 55  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib  
 60  
 <400> 251  
 65 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Met Asp Glu  
 20 25

5 <210> 252  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 10 <400> 252  
  
 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 Asp Thr  
 20 25  
  
 20 <210> 253  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es ácido Acetildiaminobutanoico  
  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib  
  
 40 <400> 253  
  
 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
  
 45 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Leu Asp Glu  
 20 25  
  
 50 <210> 254  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
  
 <220>  
 60 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Ácido acetildiamino butanoico  
  
 <220>  
 65 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (39)..(39)  
 <223> Amidación C-terminal  
 5  
 <400> 254  
 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Ala Asp Phe Val Ala Trp Leu Leu Asp Thr Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 15  
 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35  
 20 <210> 255  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 30 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Ácido acetildiamino butanoico  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib  
 40 <400> 255  
 His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 45 Arg Arg Ala Ser Asp Phe Val Ser Trp Leu Leu Asp Glu  
 20 25  
 50 <210> 256  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 55 <220>  
 <223> Polipéptido sintético  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (3)..(3)  
 <223> Xaa es Ácido acetildiamino butanoico  
 65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es Aib  
 <400> 256



ES 2 558 842 T3

His Ser Xaa Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 5 Arg Arg Ala Thr Asp Phe Val Thr Trp Leu Leu Asp Glu  
 20 25  
 10 <210> 257  
 <400> 257  
 000  
 15 <210> 258  
 <400> 258  
 000  
 20 <210> 259  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-225  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 35 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 40 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama que une Glu16 y Lys20  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 45 <222> (40)..(40)  
 <223> Epsilon amina de Lys está unida a Ala-Ac-Cys(PEG), en la que  
 Ac-Cys(PEG) es un residuo de Cys que comprende un grupo alfa amino bloqueado  
 con un grupo acetilo (CH3CO) y que comprende un PEG 40 kDa unido  
 covalentemente a su cadena lateral  
 50 <400> 259  
 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
 55 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30  
 60 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40  
 65 <210> 260  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

5

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-227

10

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

15

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama que une Glu16 y Lys20

20

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Epsilon amina de Lys está unida a Ala-Ac-Cys(PEG), en la que

25

Ac-Cys(PEG) es un residuo de Cys que comprende un grupo alfa amino bloqueado  
 con un grupo acetilo (CH<sub>3</sub>CO) y que comprende un PEG 40 kDa unido  
 covalentemente a su cadena lateral

<400> 260

30 Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15

35 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
 35 40

<210> 261  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45

<220>  
 <223> Synthetic peptide

50

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> mt-294

55

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es Aib

60

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(20)  
 <223> Puente de lactama que une Glu16 y Lys20

65

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (40)..(40)  
 <223> Cys-PEG unido covalentemente a través de enlace tioéter

ES 2 558 842 T3

<400> 261

5 Tyr Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Ile Tyr Leu Asp Glu  
1 5 10 15

10 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gly Gly Pro Ser  
20 25 30

15 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Cys  
35 40

15 <210> 262  
<211> 40  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Péptido sintético

25 <220>  
<221> MOD\_RES  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa es Aib

30 <400> 262

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

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

40 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Lys  
35 40

## REIVINDICACIONES

1. Análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP, con las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, opcionalmente, en el que el aminoácido en la posición 1 es un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol;

(b) uno, dos, tres o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo están sustituidos por un aminoácido  $\alpha,\alpha$ -disustituido,

(c) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, y

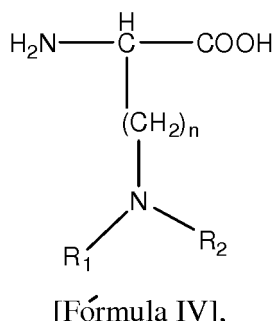
(d) 1-9 modificaciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1),

en el que la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es aproximadamente 10 nM o menos, y en el que la EC50 del análogo en el receptor de GIP es menos de aproximadamente 50 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, en el que la potencia de GIP del análogo está dentro de aproximadamente 15 veces de la potencia de GLP-1 del análogo.

2. Análogo de glucagón (SEQ ID NO: 1) que tiene actividad agonista de GIP, con las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, opcionalmente, en el que el aminoácido en la posición 1 es un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol;

(b) una sustitución de aminoácido de Ser en la posición 16 por un aminoácido de fórmula IV:



en la que n es de 1 a 7, en el que cada uno de R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)OH, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)NH<sub>2</sub>, (alquil C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub>)SH, (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)cicloalquilo (C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>), (alquilo C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>)(heterociclo C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub>), (alquil C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub>) (arilo C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>)R<sub>7</sub>, y (alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>)(heteroarilo C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub>), en el que R<sub>7</sub> es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre, siendo opcionalmente el aminoácido de fórmula IV homoLys, Lys, Orn o ácido 2,4-diaminobutírico (Dab),

(c) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 por un aminoácido alfa, alfa-disustituido, opcionalmente, AIB,

(d) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, y

(d) 1-9 modificaciones de aminoácidos adicionales en relación con la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1),

en el que la EC50 del análogo para la activación del receptor de GIP es aproximadamente 10 nM o menos, y en el que la EC50 del análogo en el receptor de GIP es menos de aproximadamente 50 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, en el que la potencia de GIP del análogo está dentro de aproximadamente 15 veces de la potencia de GLP-1 del análogo.

3. Análogo, según la reivindicación 1 ó 2, en el que (a) el aminoácido en la posición 1 es un aminoácido aromático grande, opcionalmente, Tyr y (b) en el que (ii) la Met en la posición 27 está sustituida por un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, (ii) la Asn en la posición 28 está sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, o (iii) la Thr en la posición 29 está sustituida por un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Gly, o en el que el análogo comprende una combinación de (i), (ii) y (iii).

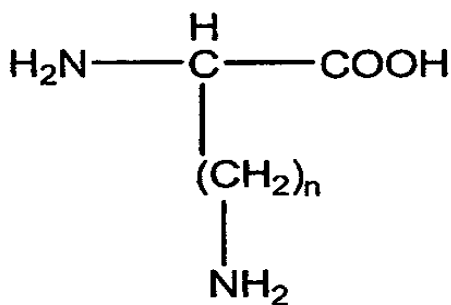
4. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96) C-terminal al aminoácido en la posición 29.

5. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende una o más de las siguientes modificaciones:

(a) Ser en la posición 2 sustituida por D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val, o ácido  $\alpha$ -amino-N-butírico;

(b) Gln en la posición 3 sustituida por Glu;

(b) sustitución del aminoácido Tyr en la posición 10 por un aminoácido, opcionalmente un aminoácido de fórmula I:



5

10

en la que  $n = 1$  a 4

- que comprende una cadena lateral unida covalentemente a un grupo acilo o grupo alquilo;
- (d) adición de un aminoácido, opcionalmente, un aminoácido de fórmula I, que comprende una cadena lateral unida covalentemente a un grupo acilo o grupo alquilo como el aminoácido C-terminal del análogo;
- (e) Lys en la posición 12 sustituida por Ile;
- (f) Arg en la posición 17 sustituida por Gln;
- (g) Arg en la posición 18 sustituida por Ala;
- (h) Asp en la posición 21 sustituida por Glu;
- (i) Gln en la posición 24 sustituida por Asn; y
- (j) una sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal por un grupo de carga neutra, opcionalmente, una amida.
6. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende (a) una modificación de aminoácido en la posición 2 que confiere resistencia a DPP-IV, y (b) un aminoácido en la posición 40 unido covalentemente a un grupo acilo o grupo alquilo.
7. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende un grupo hidrófilo unido a un aminoácido en la posición 24.
8. Análogo, según la reivindicación 2, que comprende la secuencia de aminoácidos, según cualquiera de las SEQ ID NOs: 227, 228, 229 o 230 y una extensión de 1 a 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29, opcionalmente que comprende además hasta 6 modificaciones adicionales de aminoácidos.
9. Análogo, según la reivindicación 8, en el que la extensión de 1 a 21 aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 95) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 96), en las que X es cualquier aminoácido, o una secuencia de aminoácidos que contiene una o más sustituciones conservativas con respecto a la SEQ ID NO: 95 o 96.
10. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 7-8, en el que al menos uno de los aminoácidos de la extensión, en una posición correspondiente a cualquiera de las posiciones 37-43, opcionalmente un aminoácido de fórmula I en la posición 40, está acilado o alquilado.
11. Análogo, según la reivindicación 1, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 99-141, 144-164, 166, 192-207, 209-221 y 223.
12. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105.
13. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 153.
14. Péptido que consiste en el aminoácido de SEQ ID NO: 1 con las siguientes modificaciones de aminoácidos: Tyr en la posición 1, un AIB en la posición 2, Lys en la posición 10, en el que Lys estaba unida covalentemente a un grupo acilo graso C16 a través de un espaciador de dipéptido  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Ile en la posición 12, Lys en la posición 16, Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, AIB en la posición 20, Glu en la posición 21, Asn en la posición 24, Leu en la posición 27, Ala en la posición 28, Gly en la posición 29, seguido del aminoácido de SEQ ID NO: 95 C-terminal al aminoácido en la posición 29, y una amida C-terminal en lugar del alfa carboxilato C-terminal.
15. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 105, en el que la EC50 del péptido para la activación del receptor de GIP es aproximadamente 10 nM o menos, y en el que la EC50 del péptido en el receptor de GIP es menos de aproximadamente 50 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, en el que la potencia de GIP del péptido está dentro de aproximadamente 15 veces de la potencia de GLP-1 del péptido.
16. Péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 146 o SEQ ID NO: 153, en el que la EC50 del péptido para la activación del receptor de GIP es

aproximadamente 10 nM o menos, y en el que la EC50 del péptido en el receptor de GIP es menos de aproximadamente 50 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, en el que la potencia de GIP del péptido está dentro de aproximadamente 15 veces de la potencia de GLP-1 del péptido.

- 5 17. Péptido que comprende el aminoácido de SEQ ID NO: 1 con las siguientes modificaciones de aminoácidos: Tyr en la posición 1, un AIB en la posición 2, Lys en la posición 10, en el que Lys estaba unida covalentemente a un grupo acilo graso C16 a través de un espaciador de dipéptido  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu, Ile en la posición 12, Lys en la posición 16, Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, AIB en la posición 20, Glu en la posición 21, Asn en la posición 24, Leu en la posición 27, Ala en la posición 28, Gly en la posición 29, seguido del aminoácido de SEQ ID NO: 95 C-terminal al aminoácido en la posición 29, y una amida C-terminal en lugar del alfa carboxilato C-terminal, en el que la EC50 del péptido para la activación del receptor de GIP es aproximadamente 10 nM o menos, y en el que la EC50 del péptido en el receptor de GIP es menos de aproximadamente 50 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, en el que la potencia de GIP del péptido está dentro de aproximadamente 15 veces de la potencia de GLP-1 del péptido.
- 10
- 15 18. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende un grupo acilo o grupo alquilo que está unido a la cadena lateral de aminoácido a través de un espaciador, opcionalmente en el que espaciador es de 3 a 10 átomos de longitud y es un dipéptido, opcionalmente, en el que el espaciador comprende dos aminoácidos cargados negativamente.
- 20 19. Análogo, según la reivindicación 18, en el que el grupo acilo es un grupo acilo graso C12 a C18, opcionalmente un grupo acilo graso C14 o C16.
- 25 20. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-19, o el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en el que el análogo o el péptido está unido covalentemente a un grupo hidrófilo, opcionalmente un polietilenglicol (PEG), en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 19, 20, 23, 24, 27, 32, 43 o el extremo C-terminal, opcionalmente, en el que el grupo hidrófilo está unido covalentemente a Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina.
- 30 21. Análogo o péptido, según la reivindicación 20, en el que el PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.
- 35 22. Conjugado, dímero o péptido de fusión que comprende un análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-21, o el péptido según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 o 20-21.
- 40 23. Composición farmacéutica que comprende el análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-21, o el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 o 20-21, el conjugado, dímero o péptido de fusión, según la reivindicación 22, o una combinación de los mismos, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 45 24. Kit que comprende una composición farmacéutica, según la reivindicación 23, y un dispositivo para administrar dicha composición farmacéutica a un paciente, opcionalmente, en el que el dispositivo comprende una jeringa que comprende la composición farmacéutica.
- 50 25. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-21, o el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 o 20-21, para utilizar en la reducción del aumento de peso o la inducción de la pérdida de peso, utilización de un análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-21, o el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 o 20-21, en la preparación de un medicamento para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso.
26. Análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-21, o el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 o 20-21, para utilizar en el tratamiento de la diabetes, o utilización de un análogo, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o 18-21, o el péptido, según cualquiera de las reivindicaciones 12-17 o 20-21, en la preparación de un medicamento para tratar la diabetes.

Figura 1

**Cambio en el % de peso corporal (BW)**

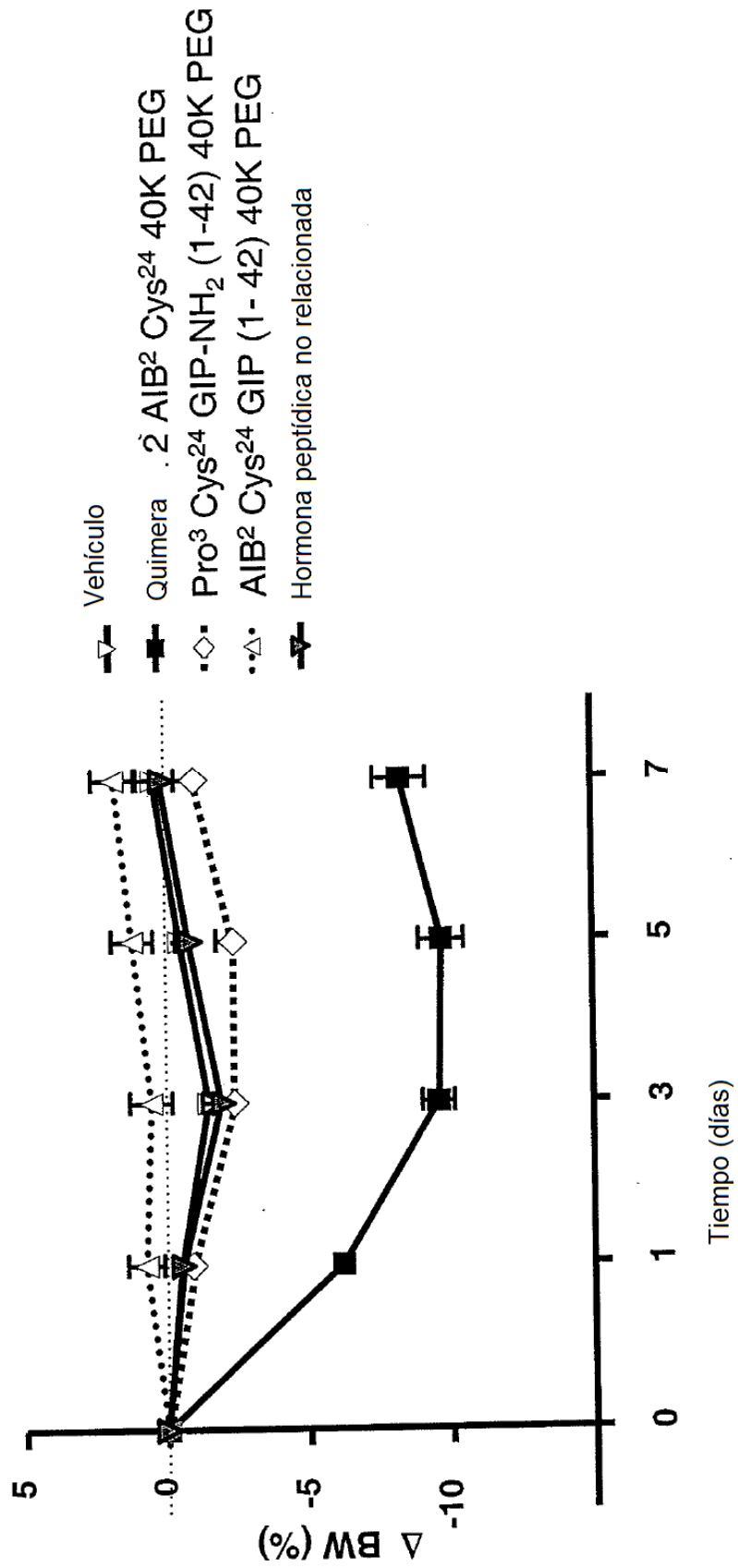


Figura 2

### Ingestión acumulada de alimentos (FI)

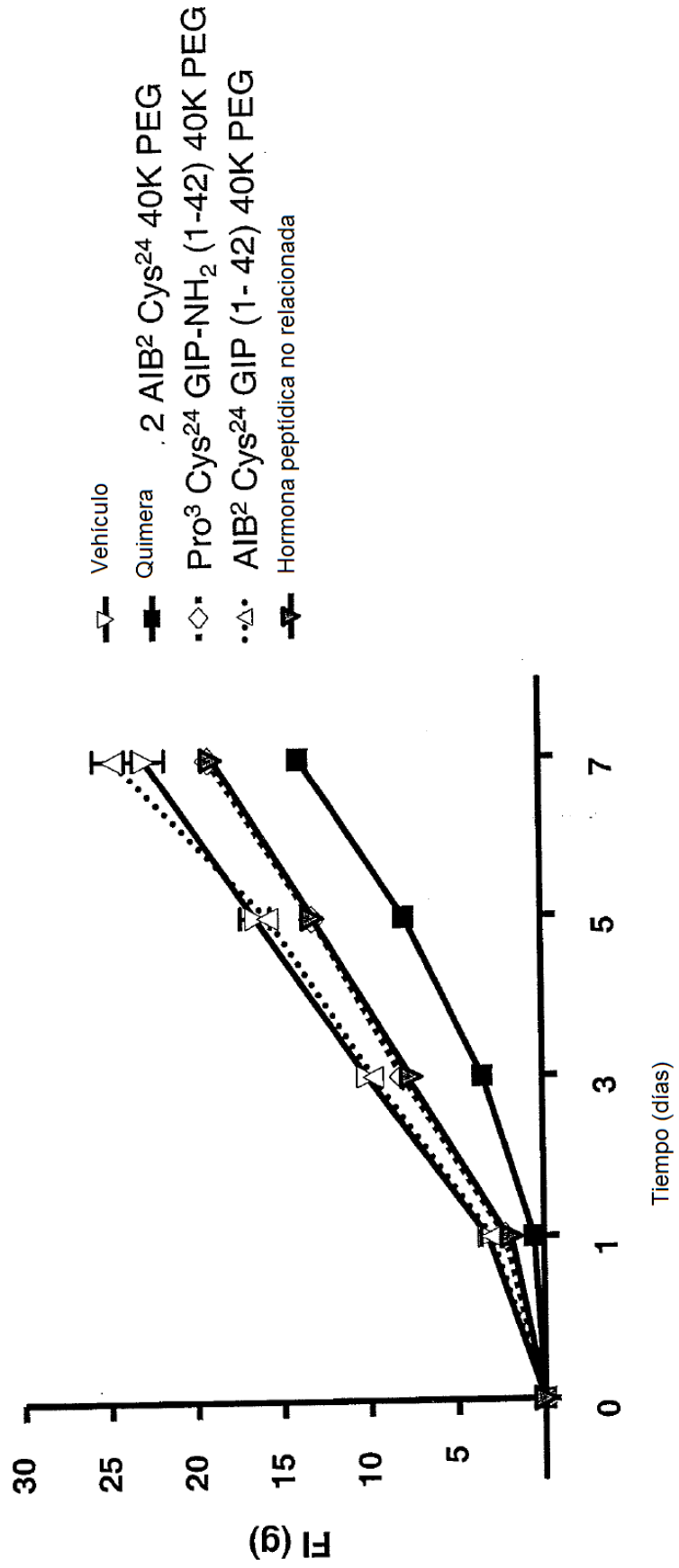




Figura 3

### Cambio de glucosa en sangre (BG)

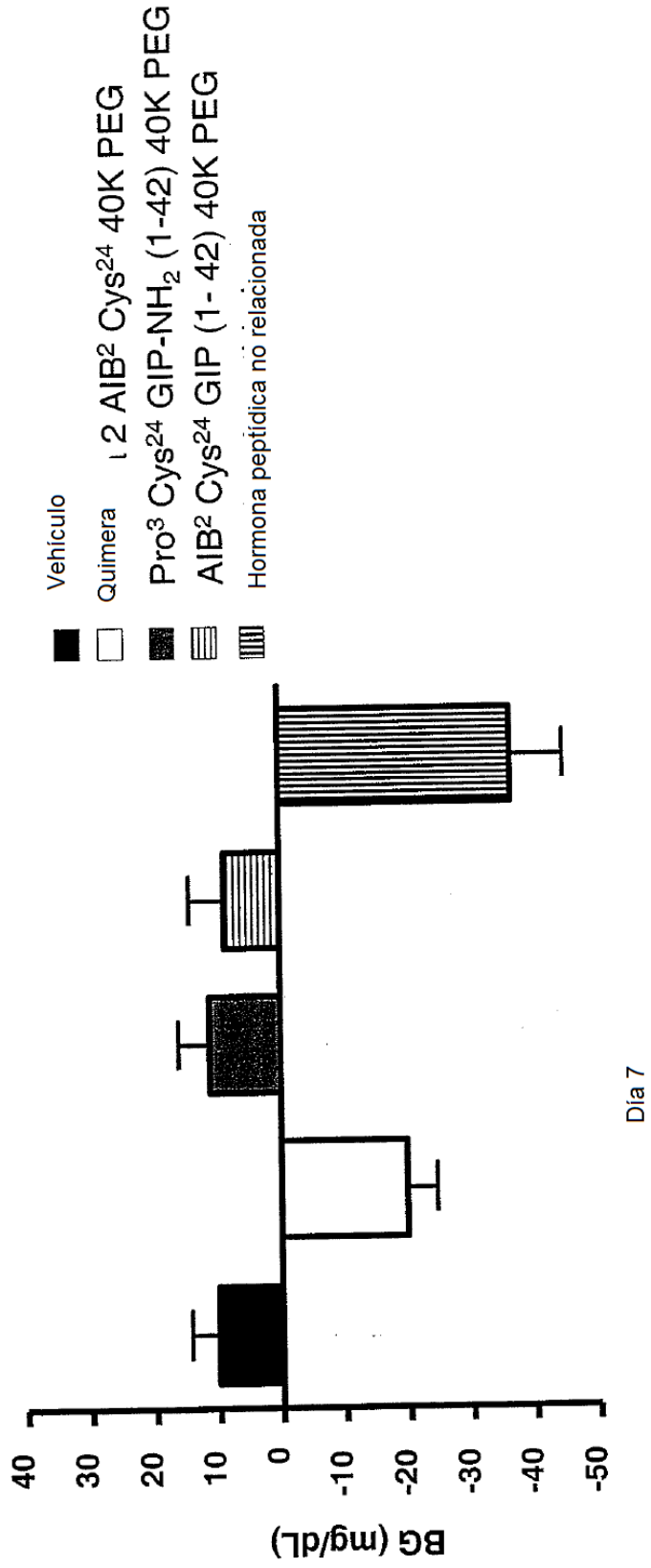


Figura 4

### Cambio en el peso corporal (BW)

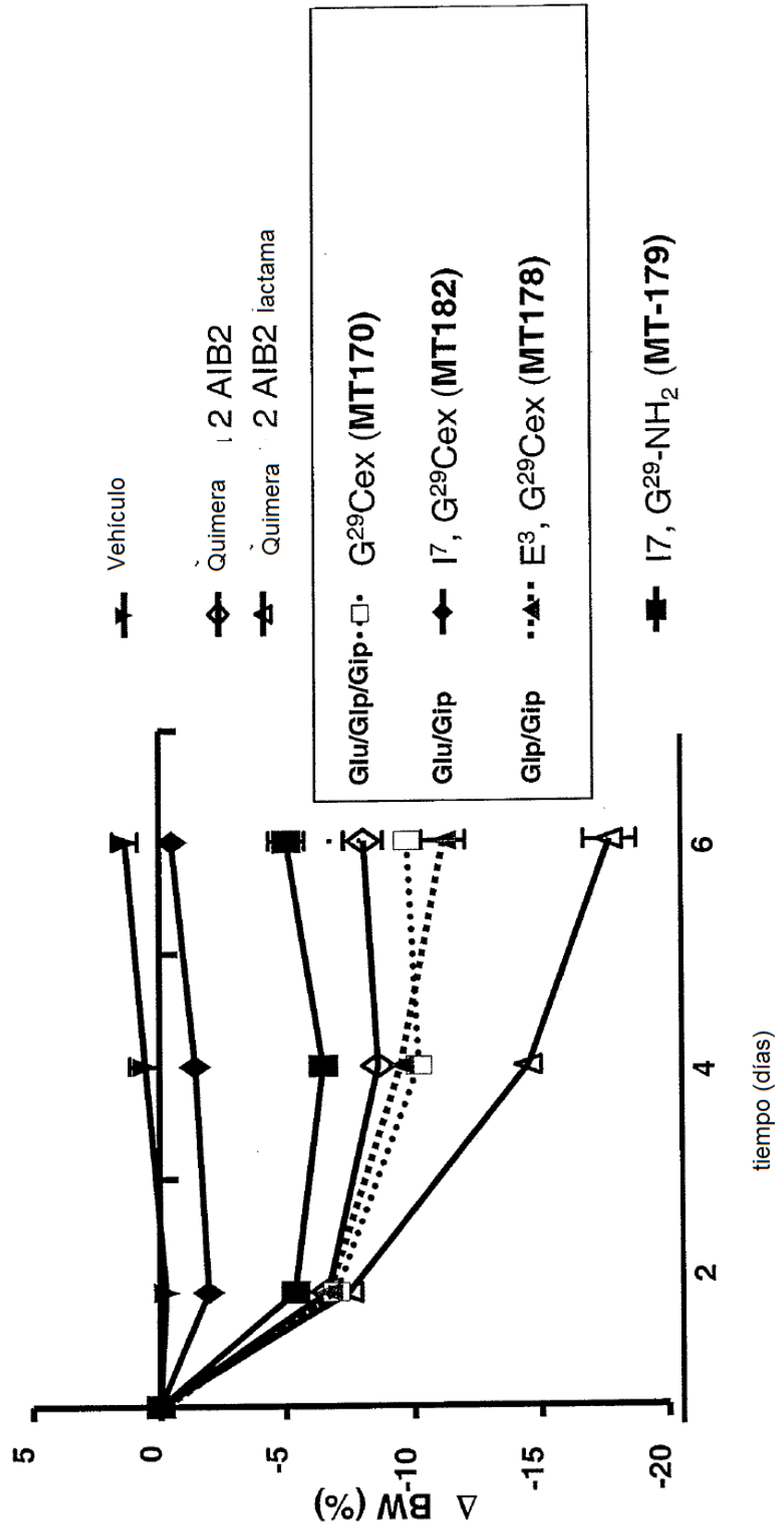


Figura 5

**Cambio en el % de peso corporal (BW)**

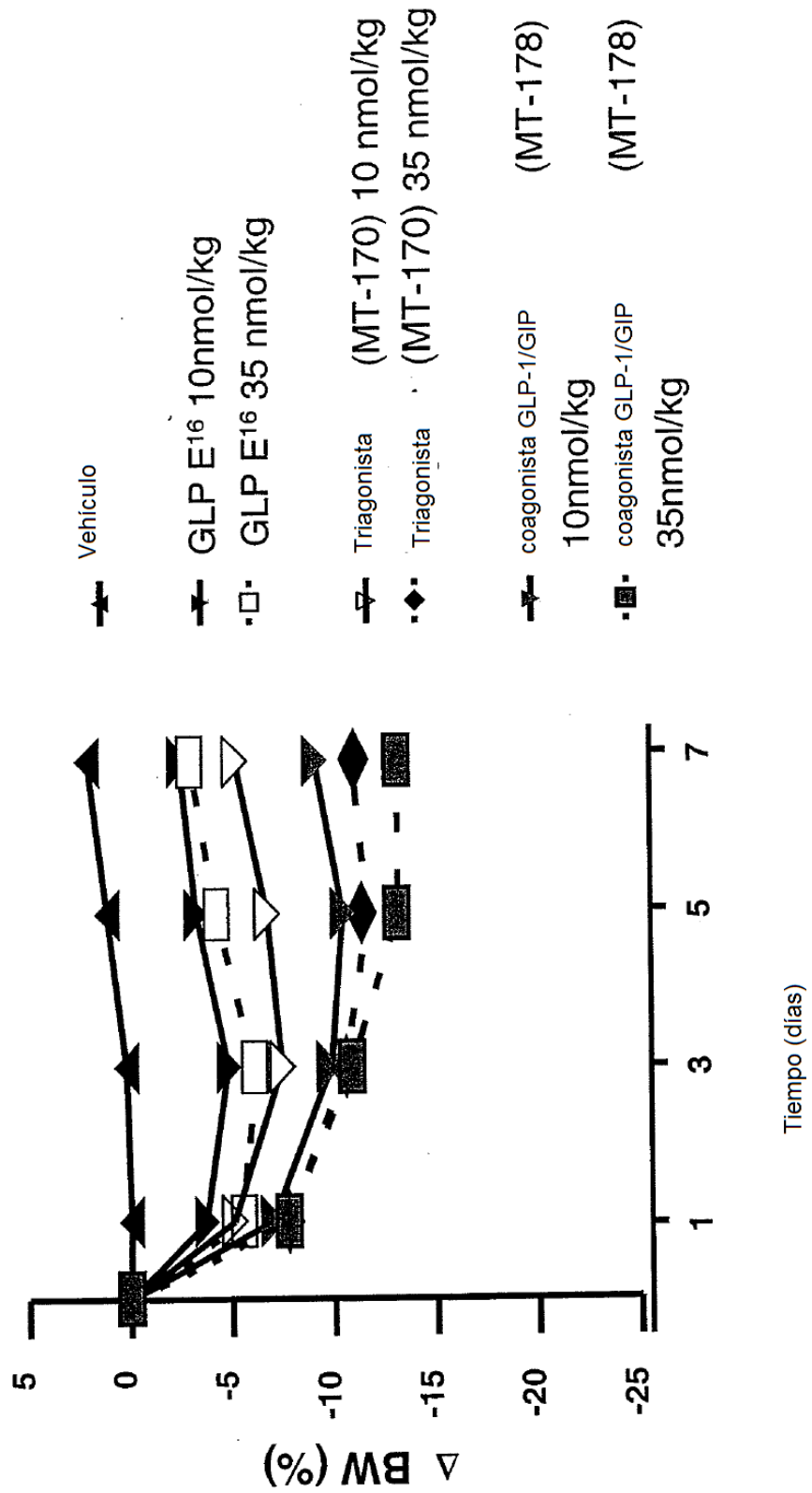
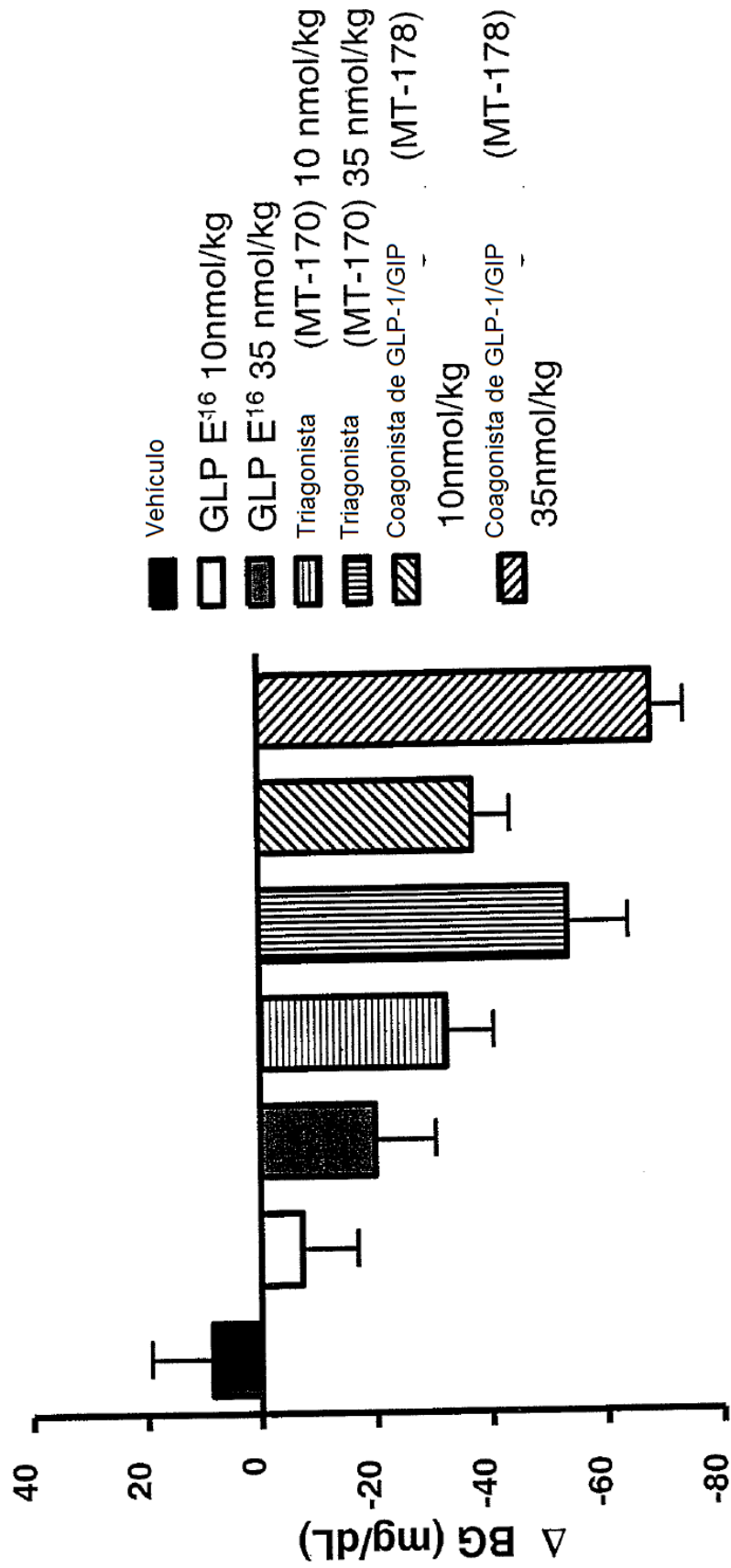


Figura 6

### Cambio de la glucosa en sangre (BG)



Día 7

Figura 7

Test de tolerancia a la glucosa 1 hora  
 \*excluidos 4 ratones

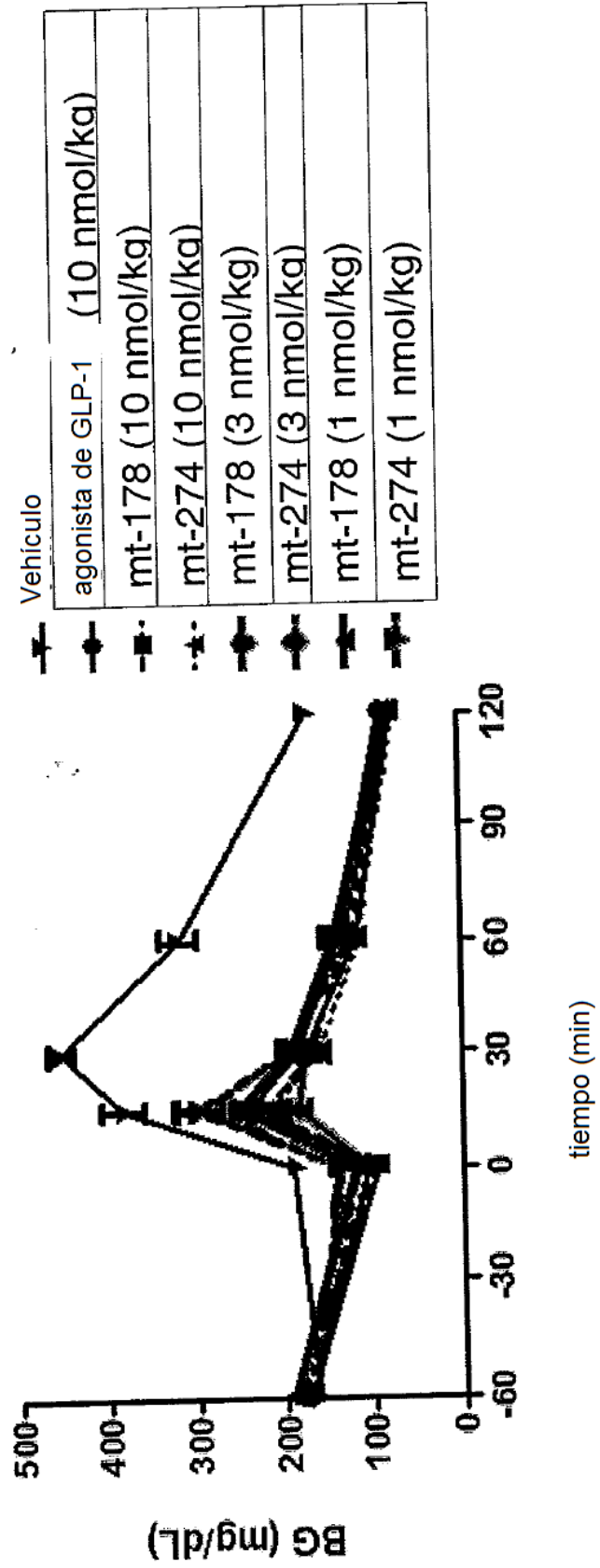


Figura 8

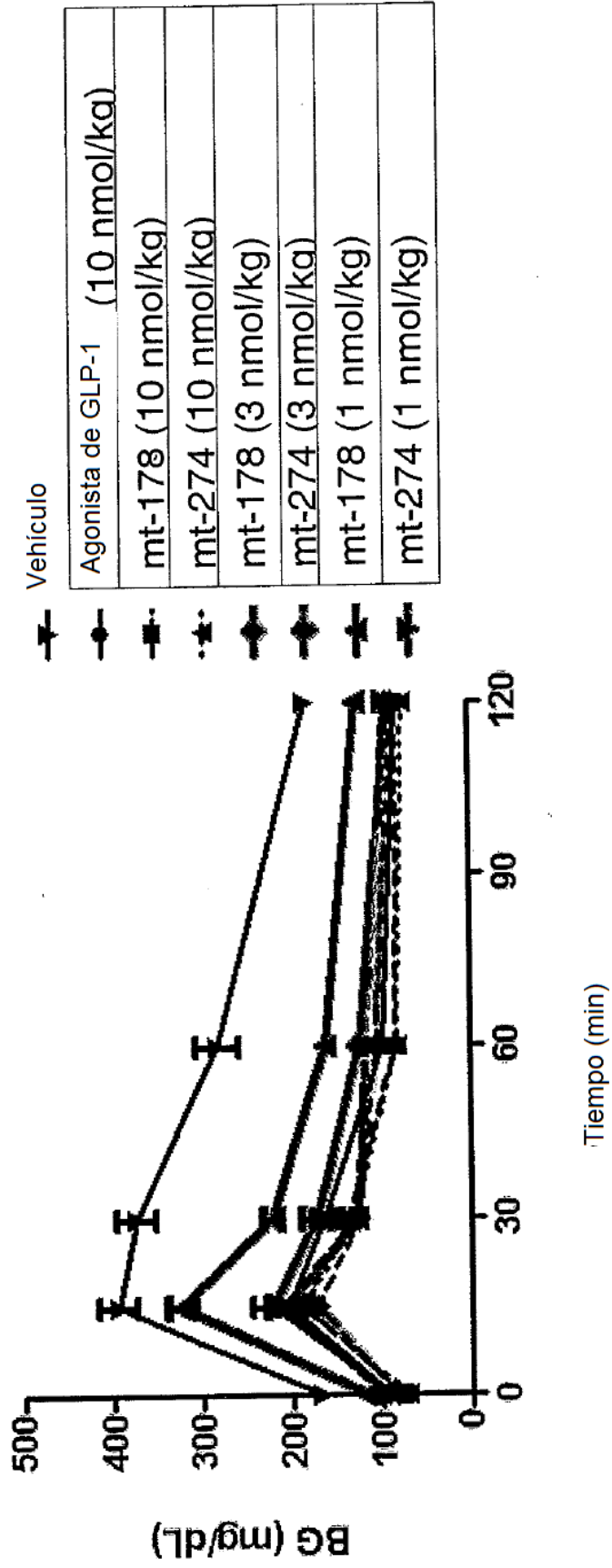


Figura 9

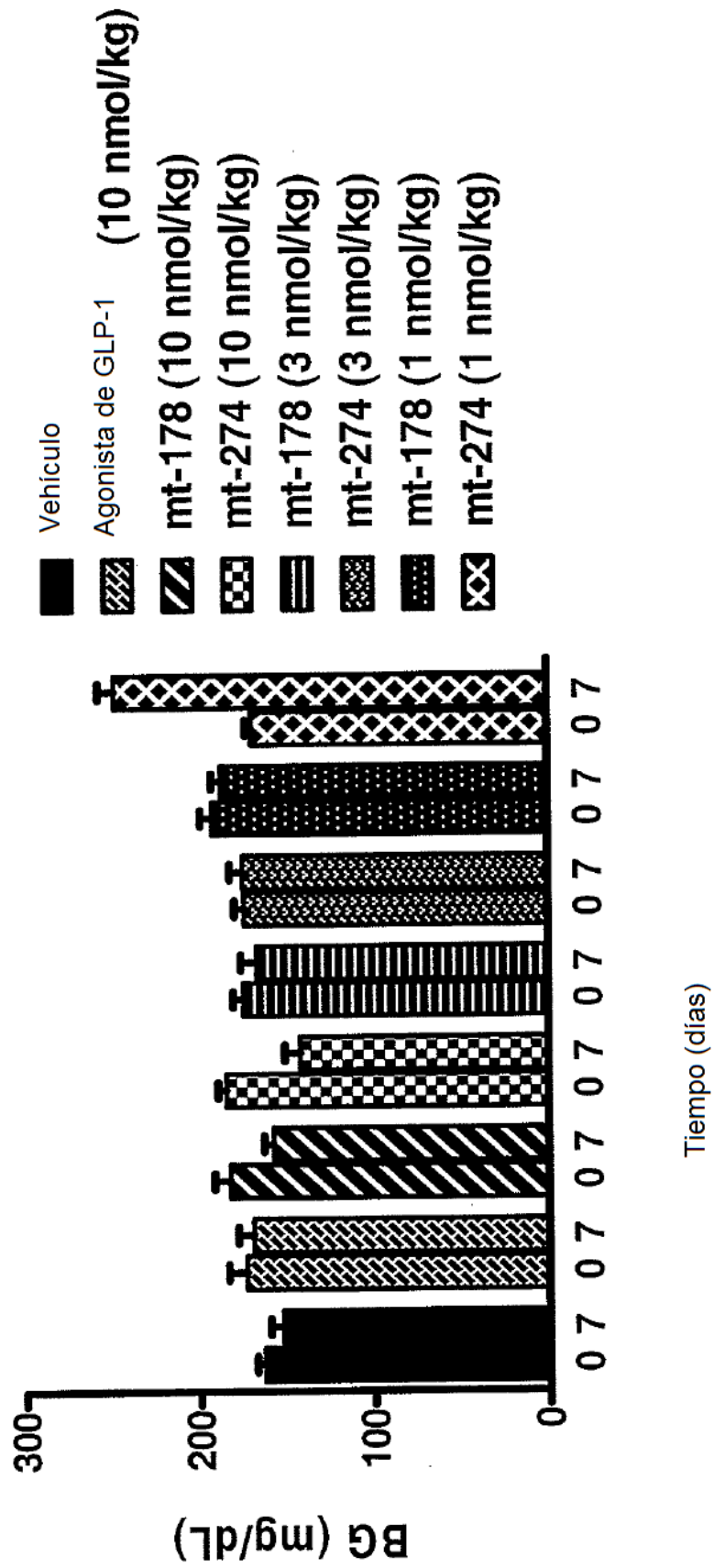


Figura 10

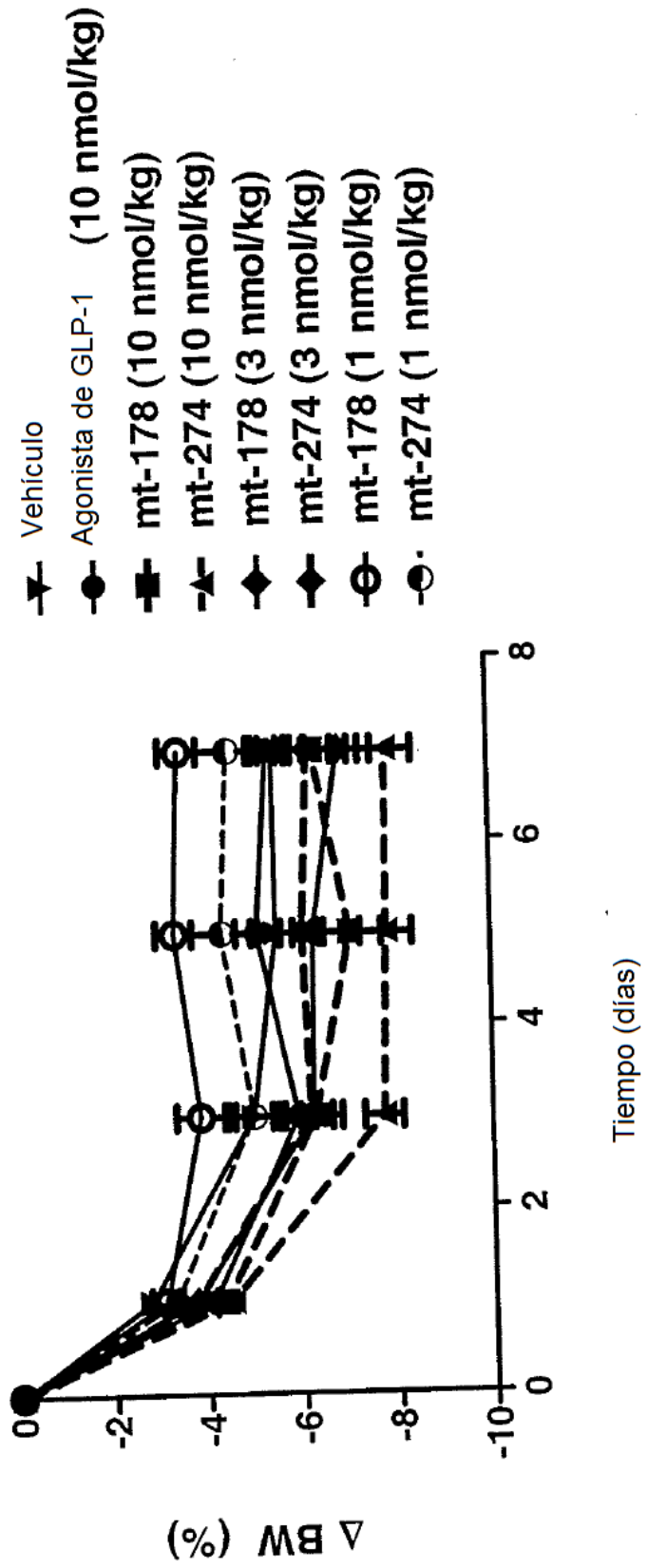




Figura 11

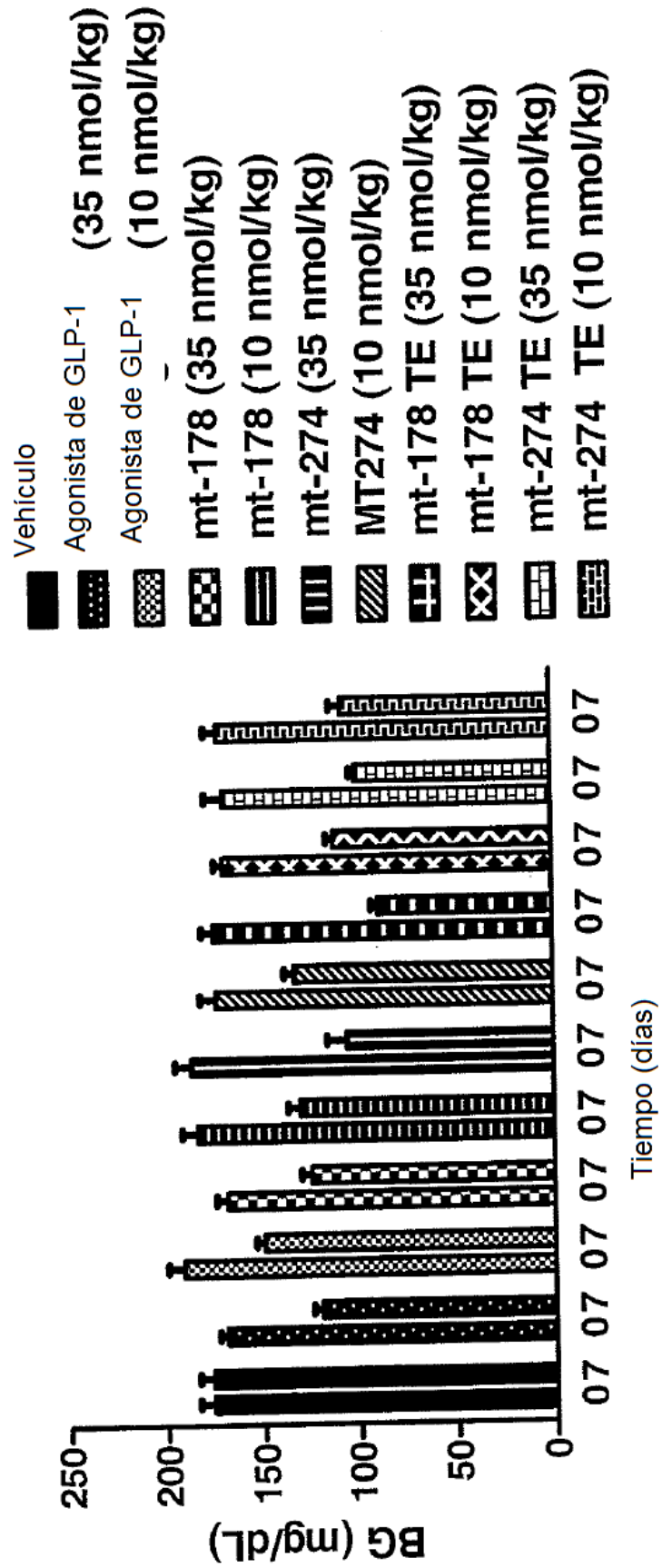


Figura 12

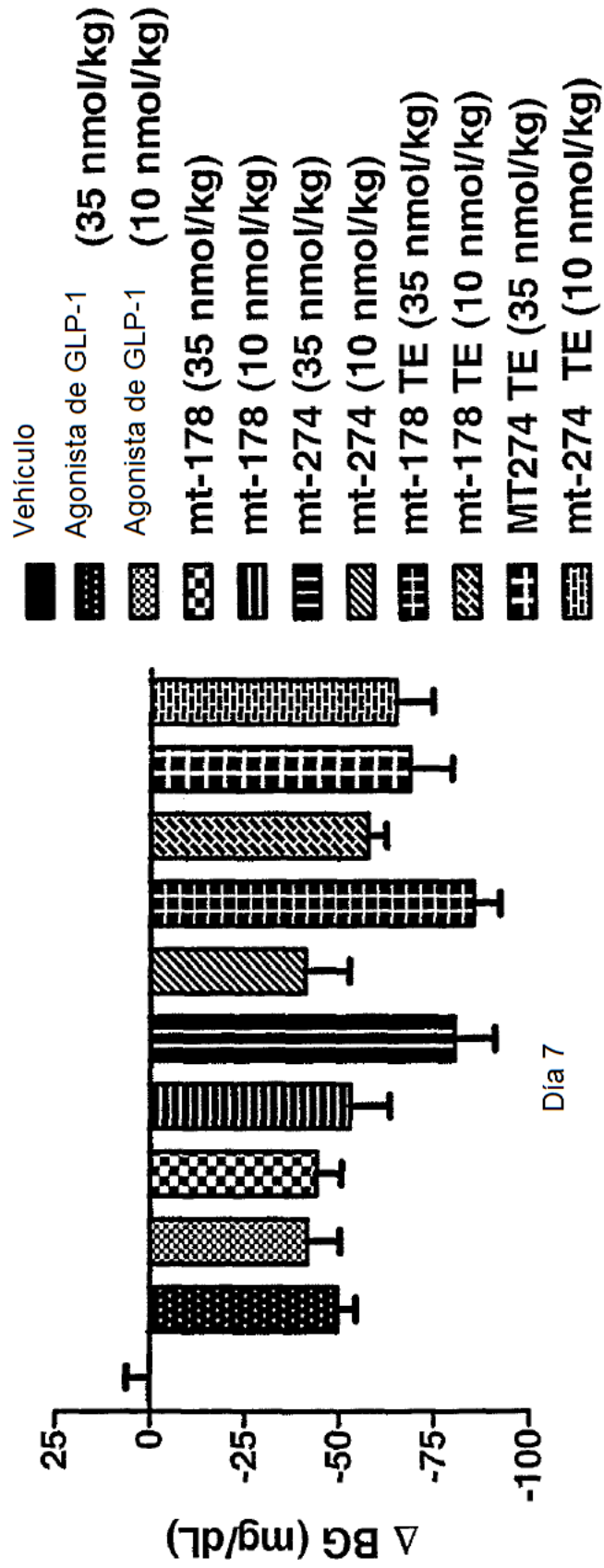


Figura 13

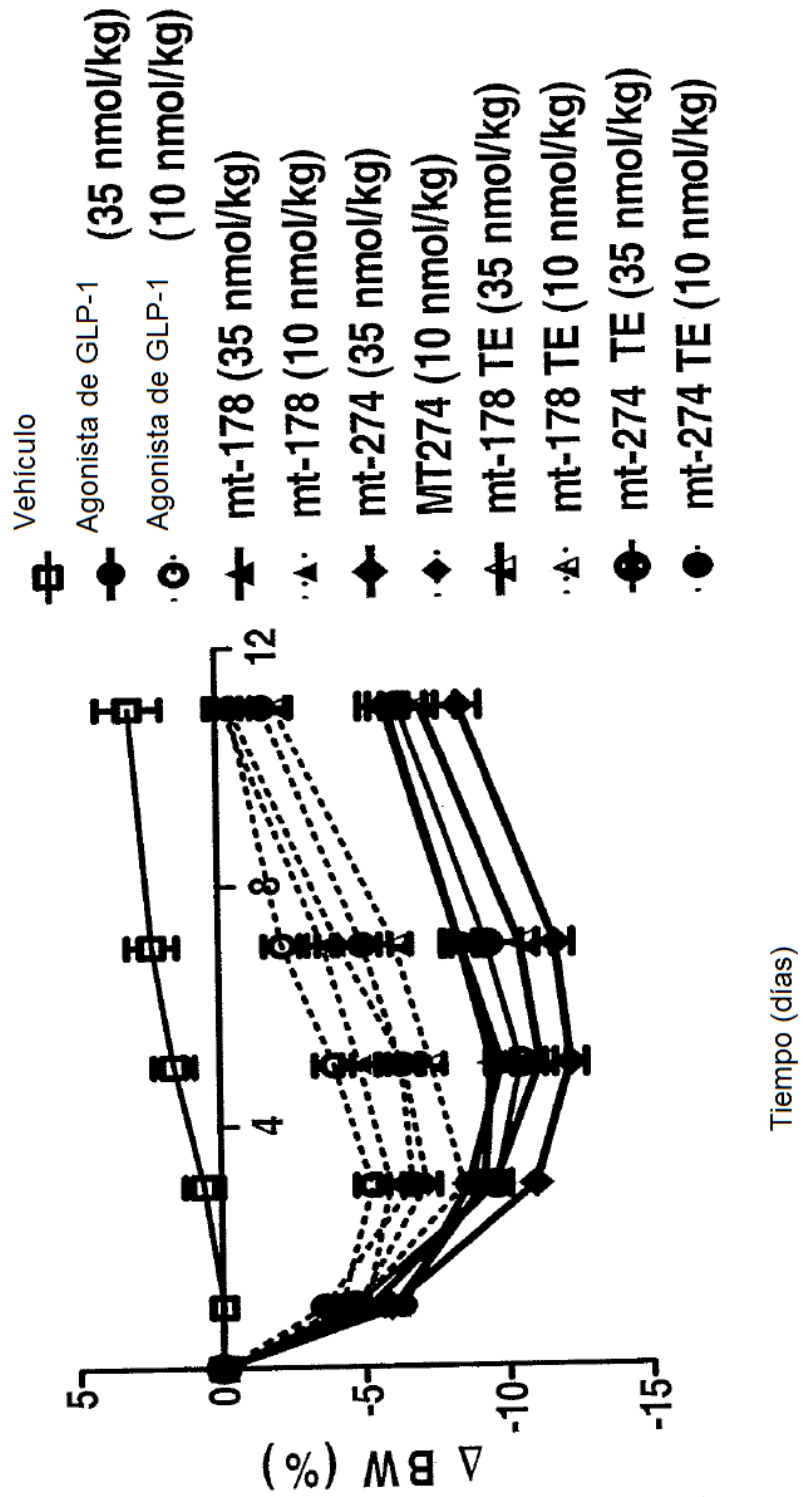


Figura 14

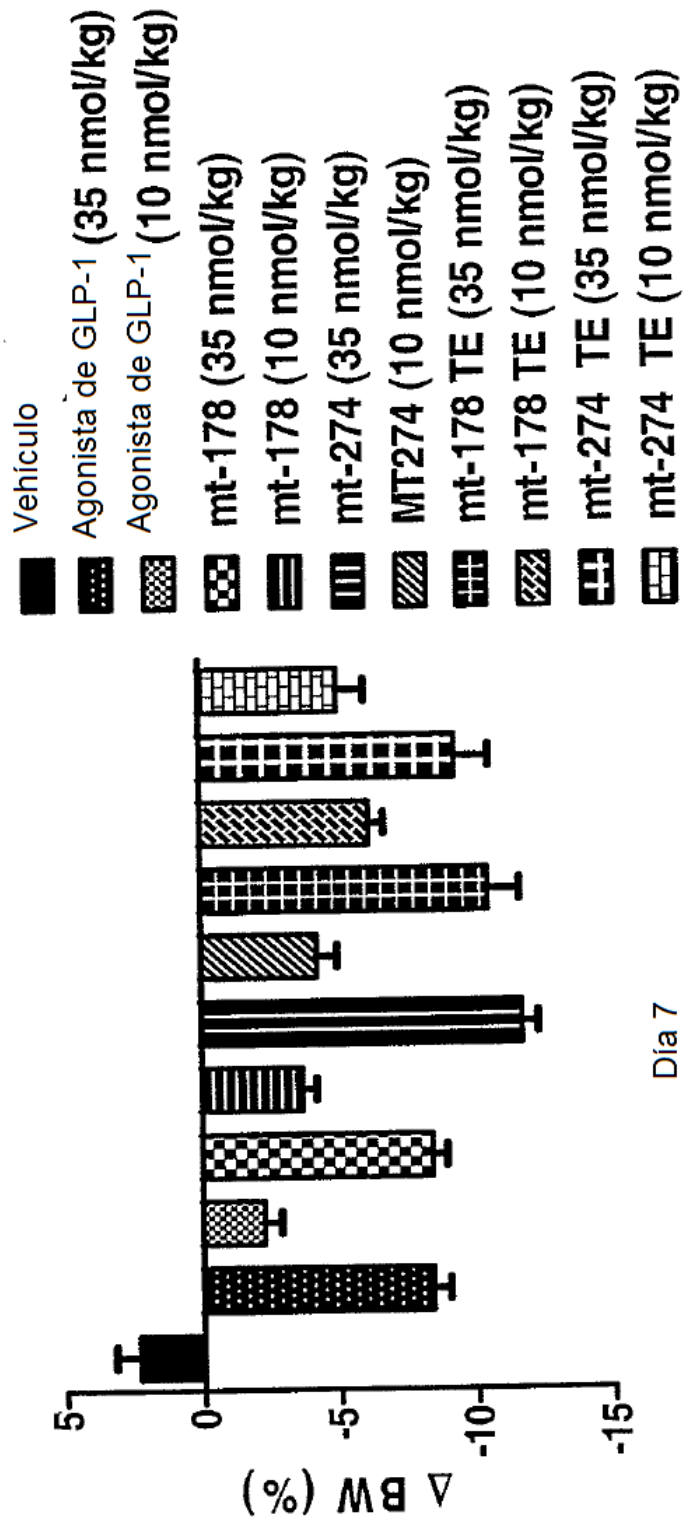


Figura 15

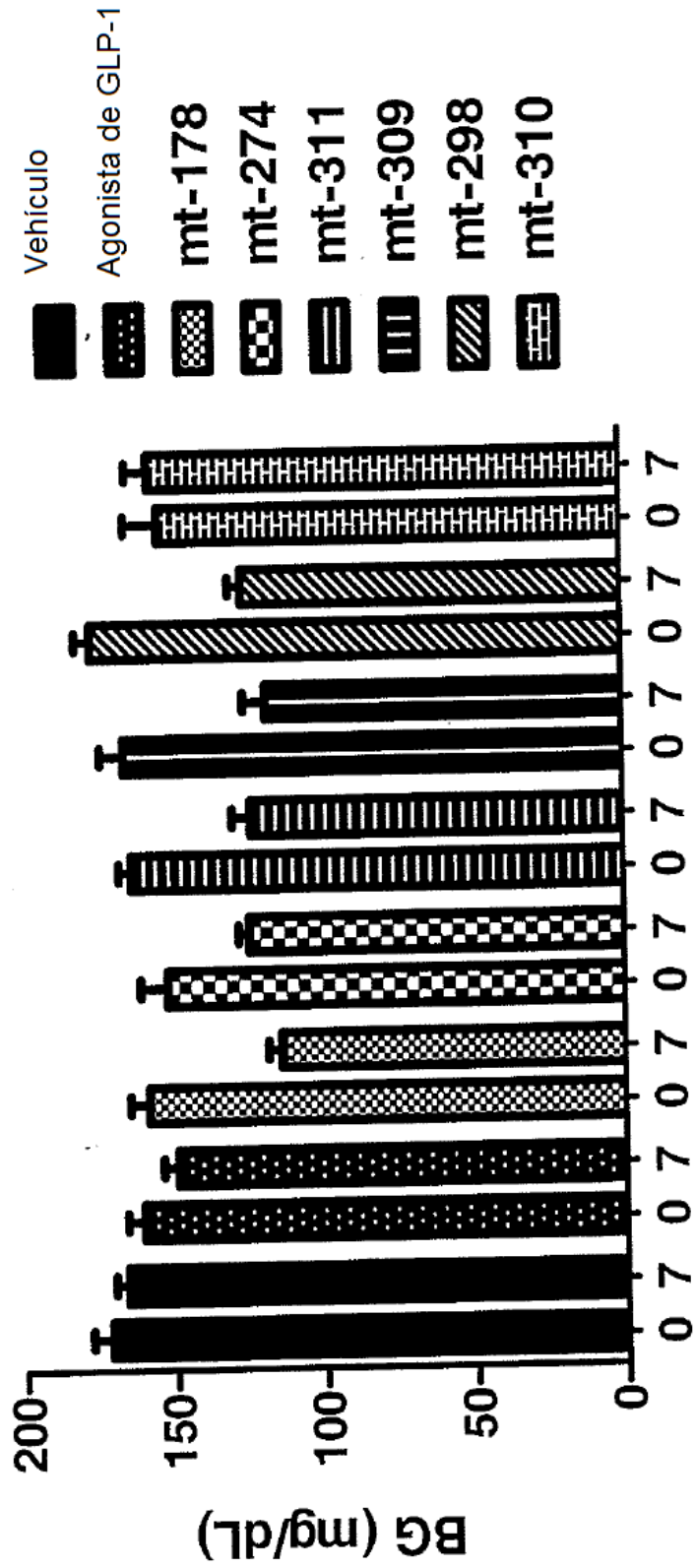


Figura 16

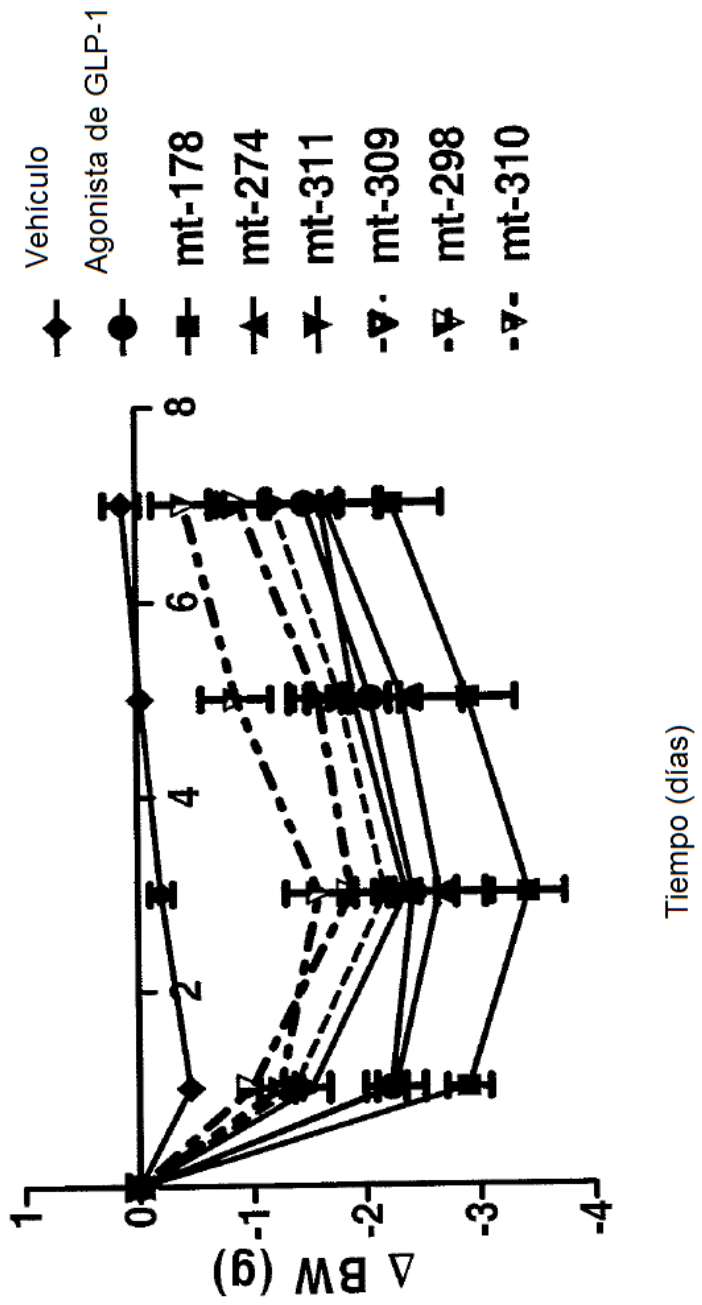


Figura 17

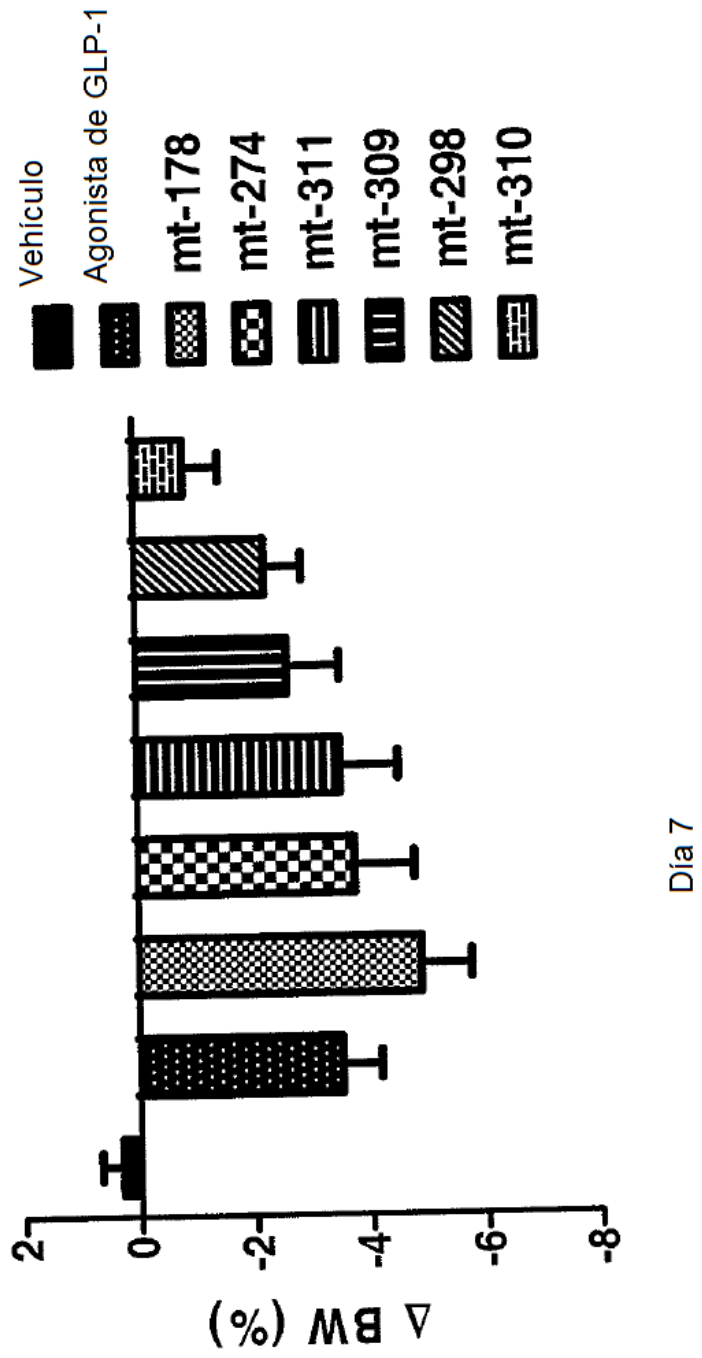


Figura 18

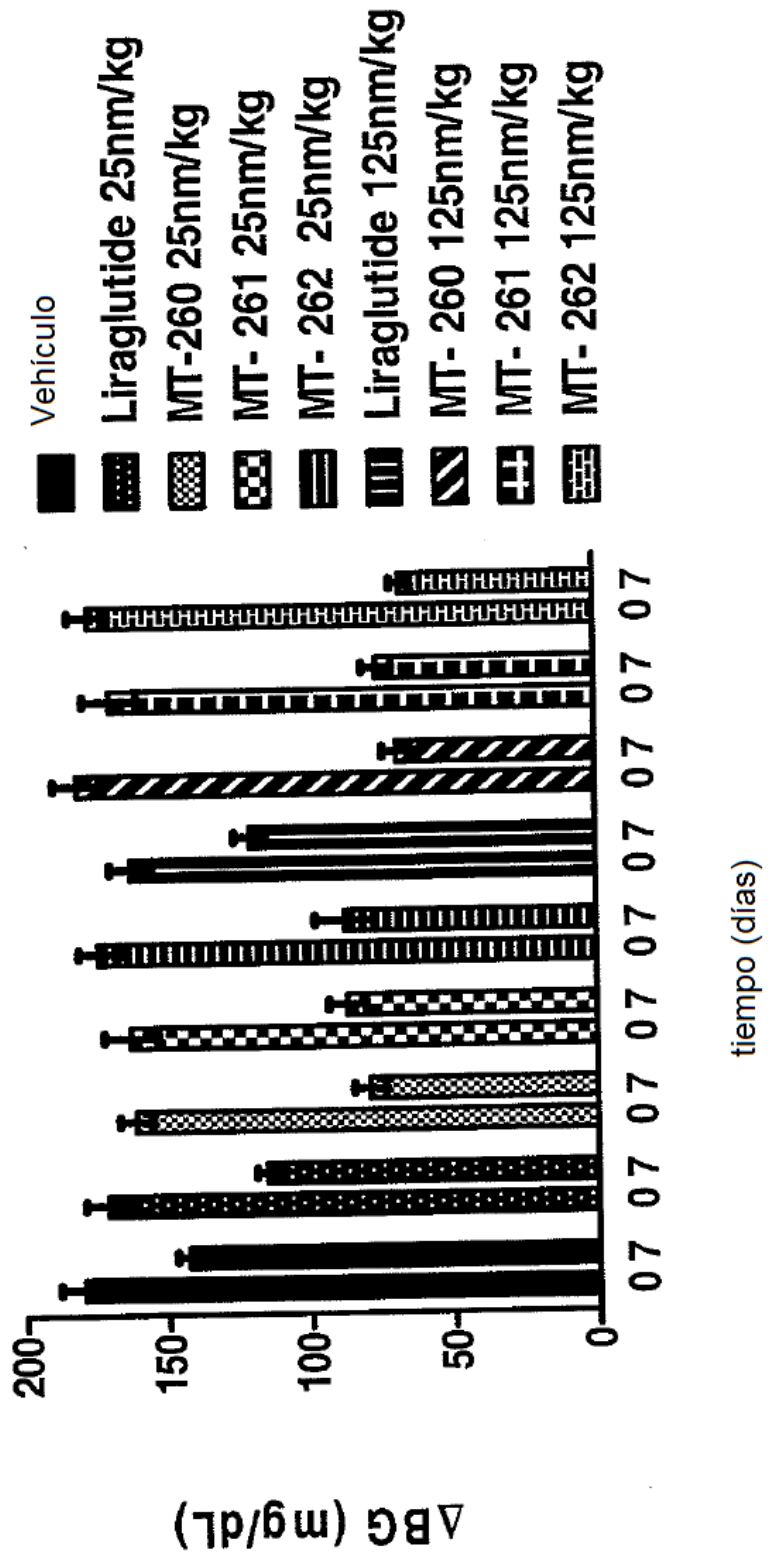




Figura 19

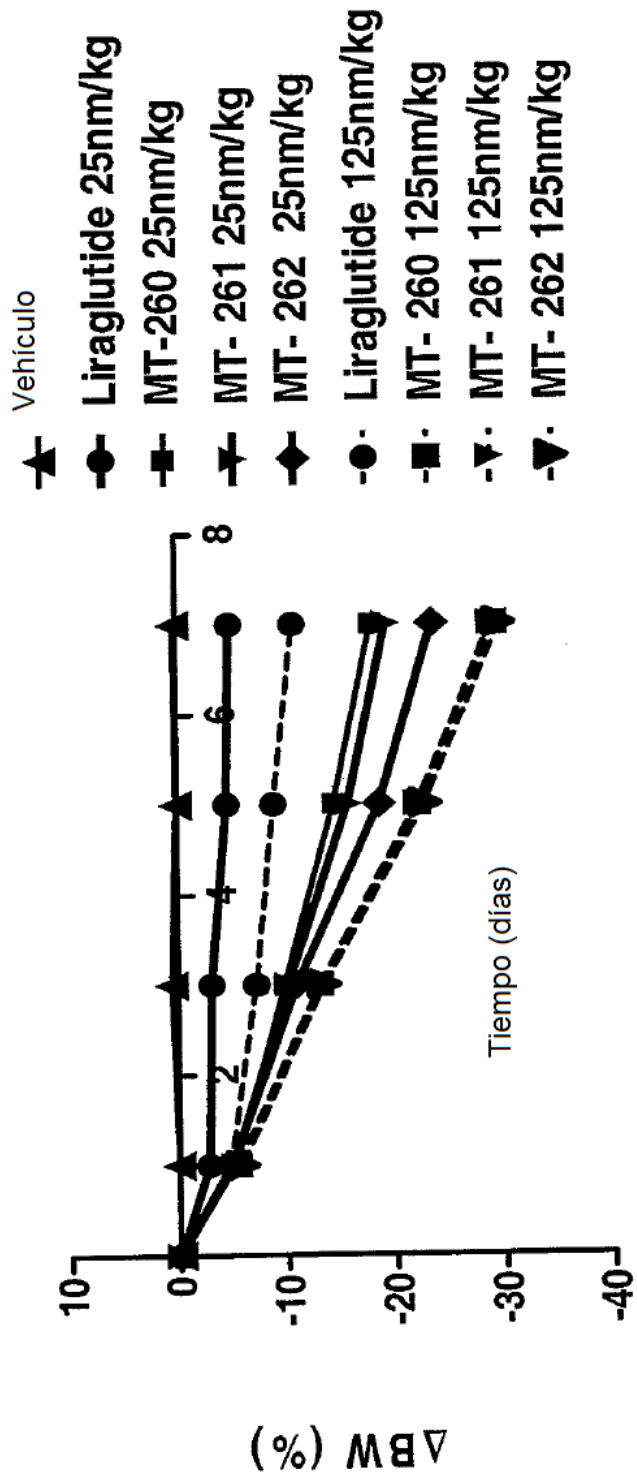


Figura 20

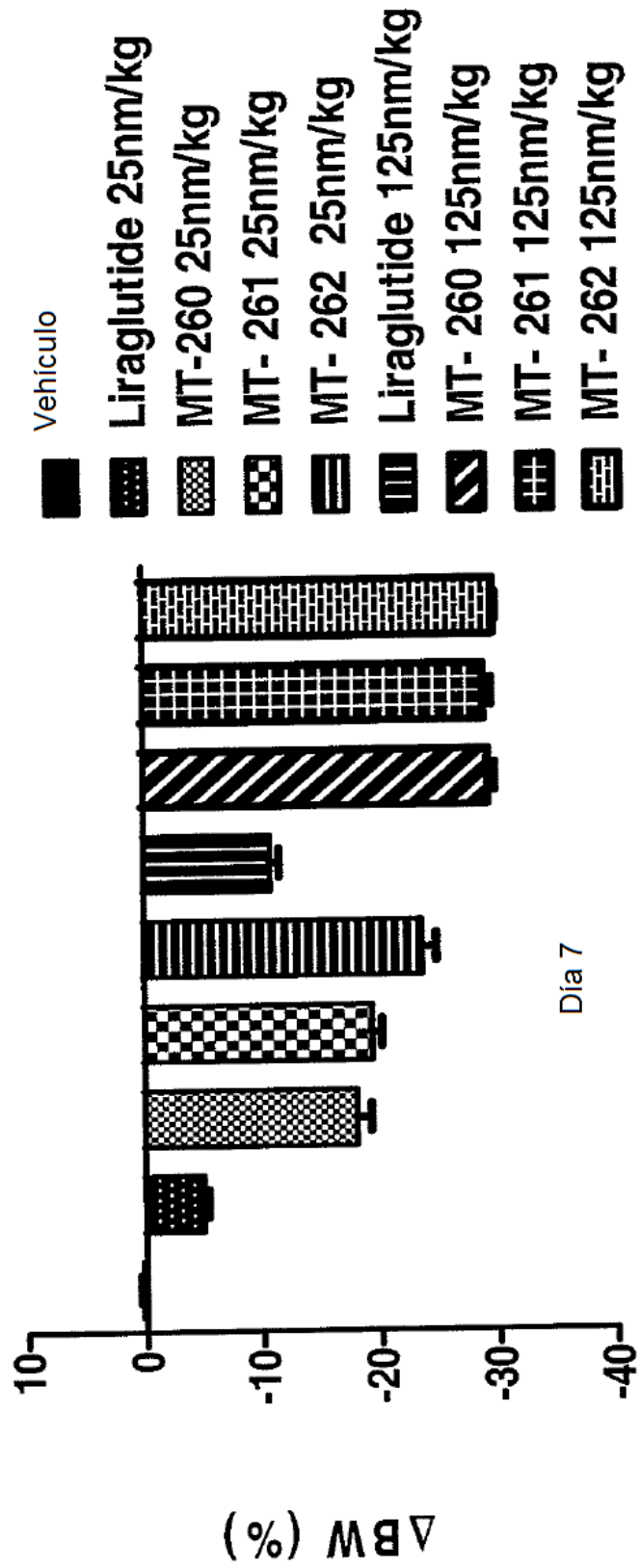


Figura 21

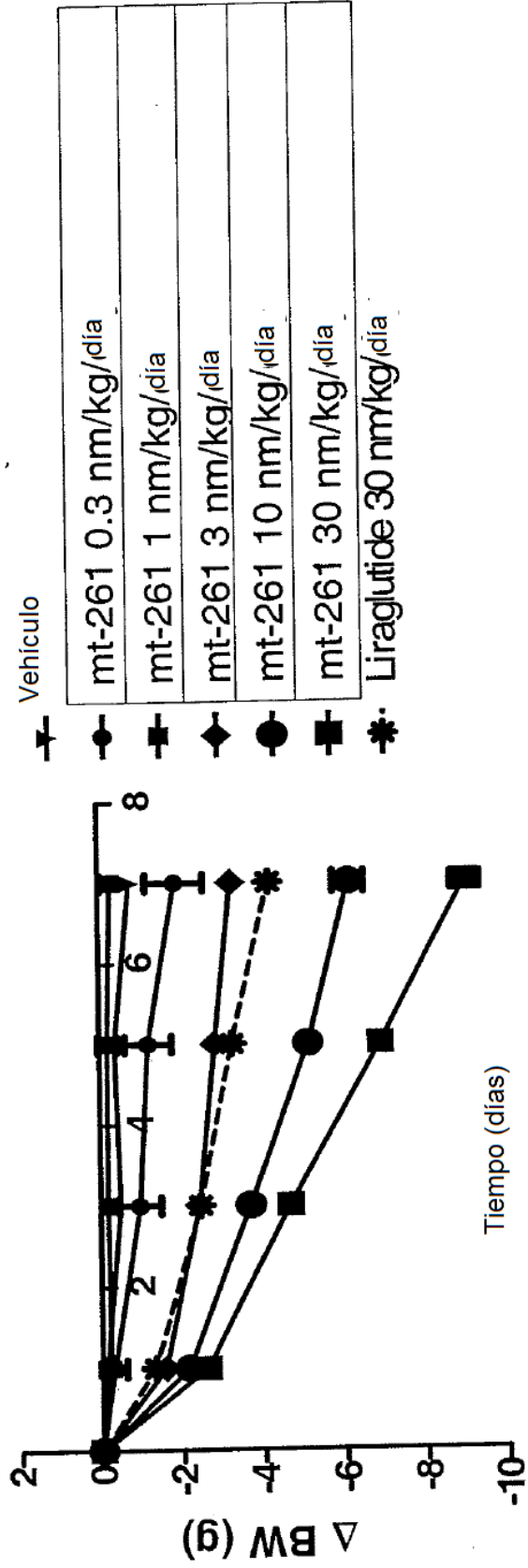


Figura 22

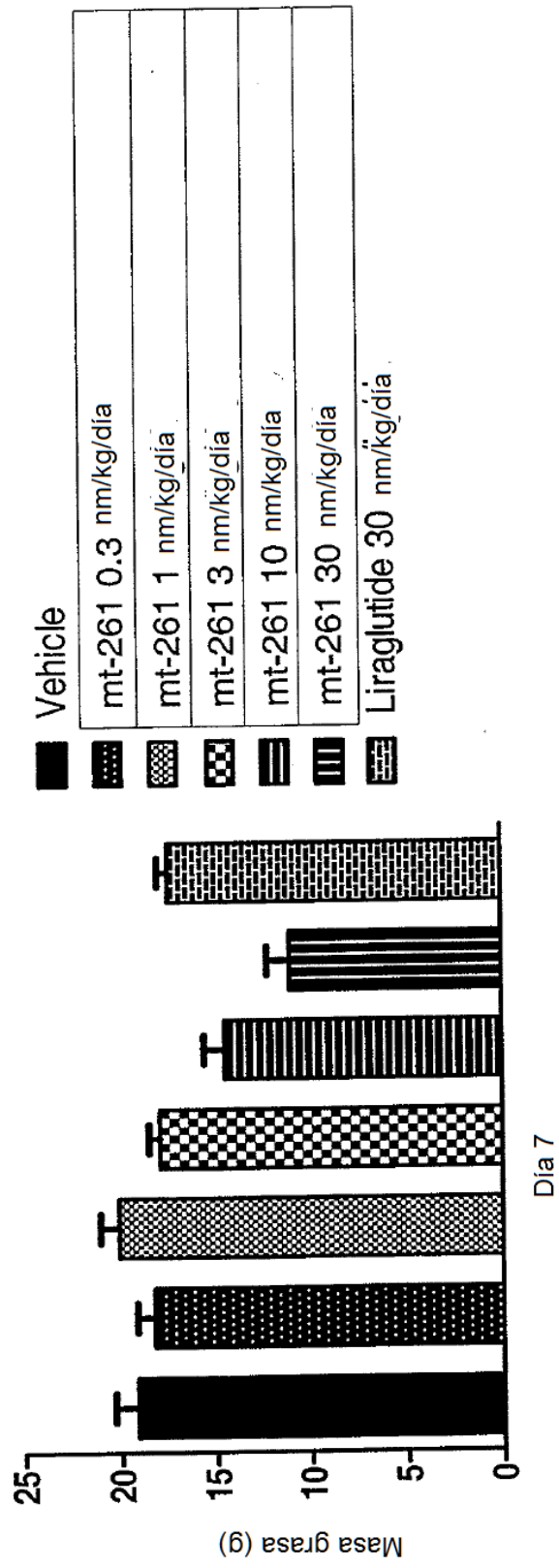


Figura 23

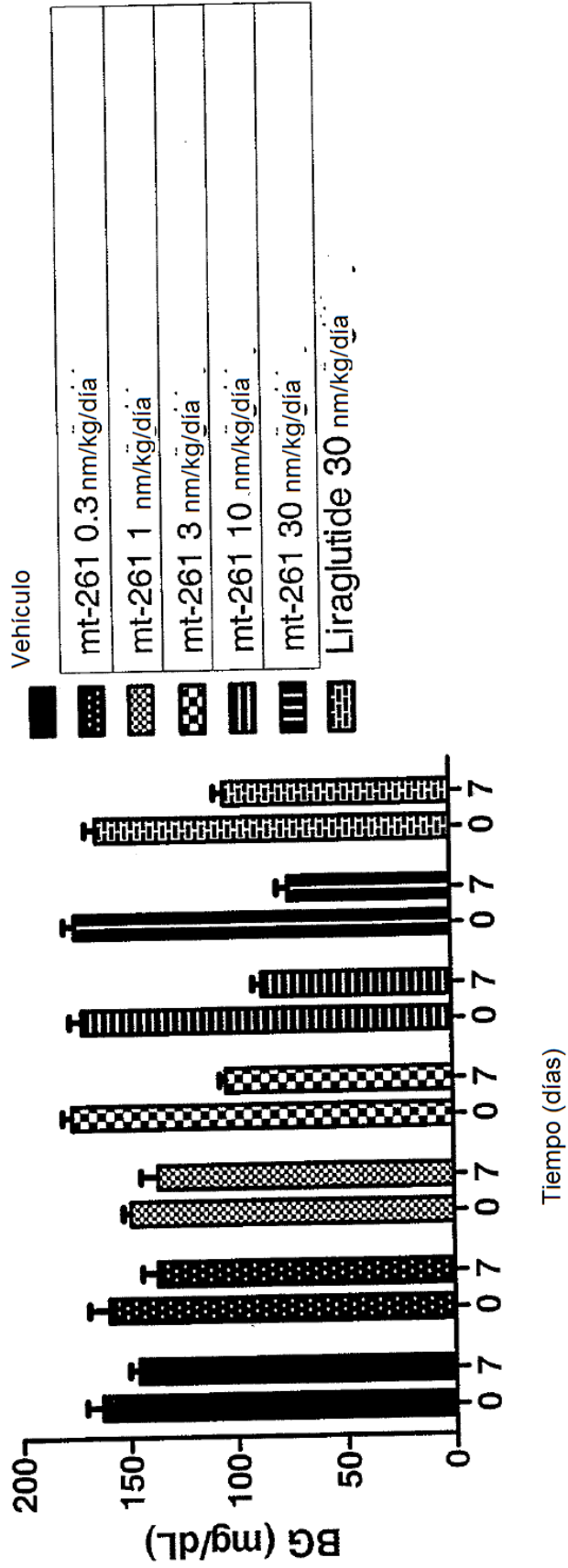


Figura 24

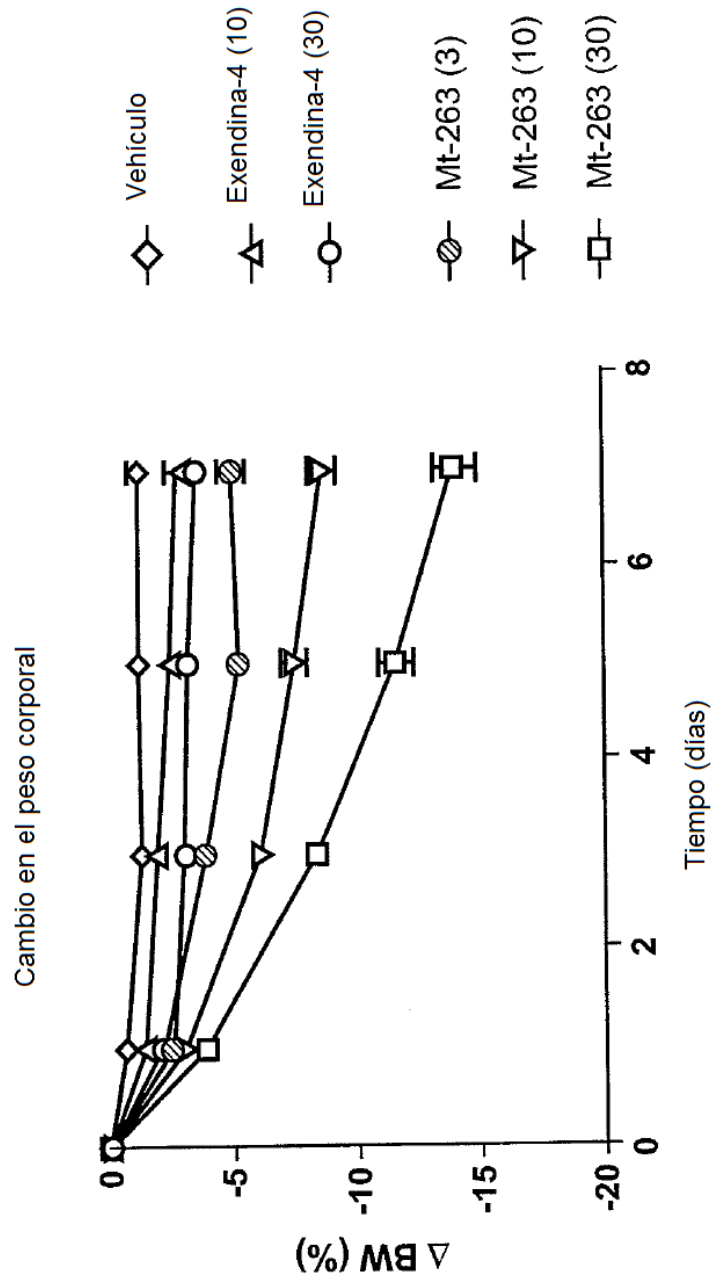


Figura 25

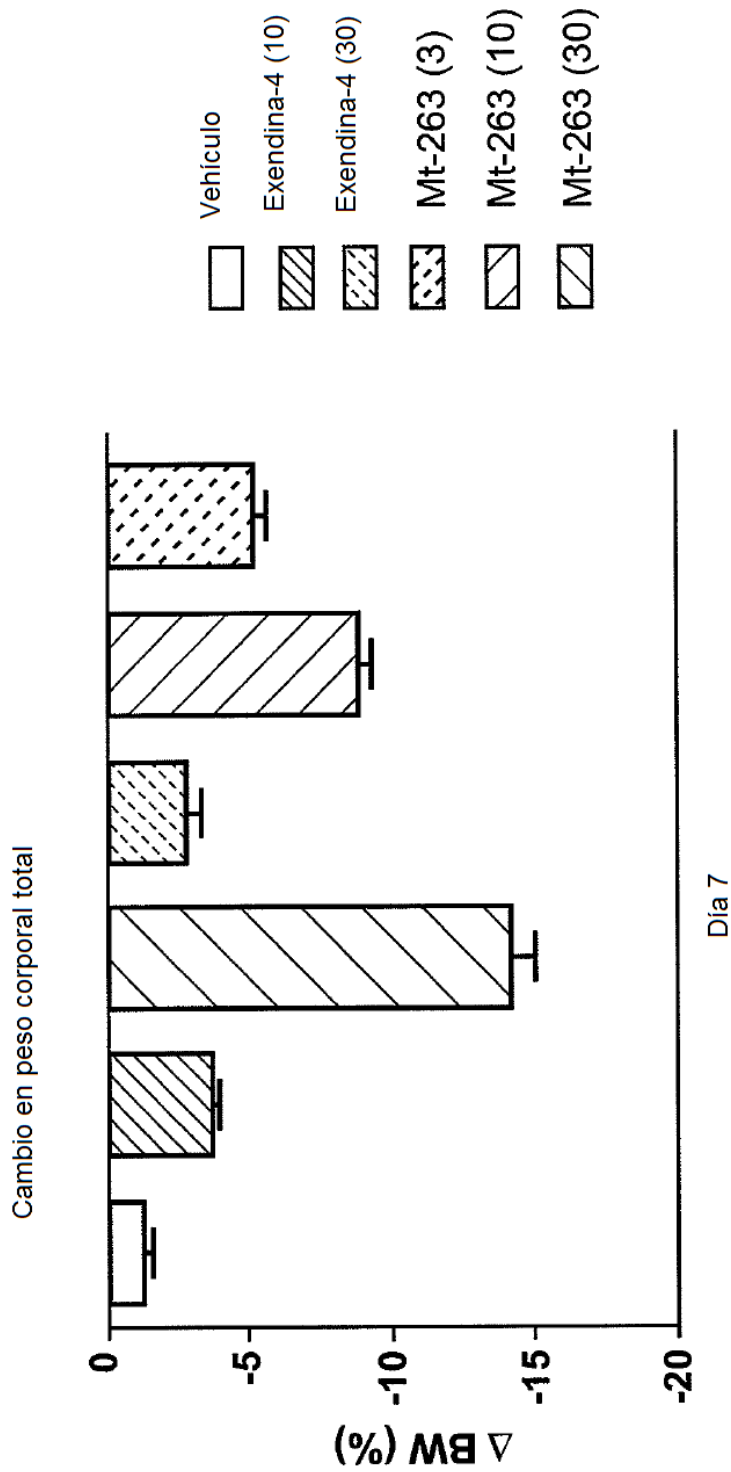


Figura 26

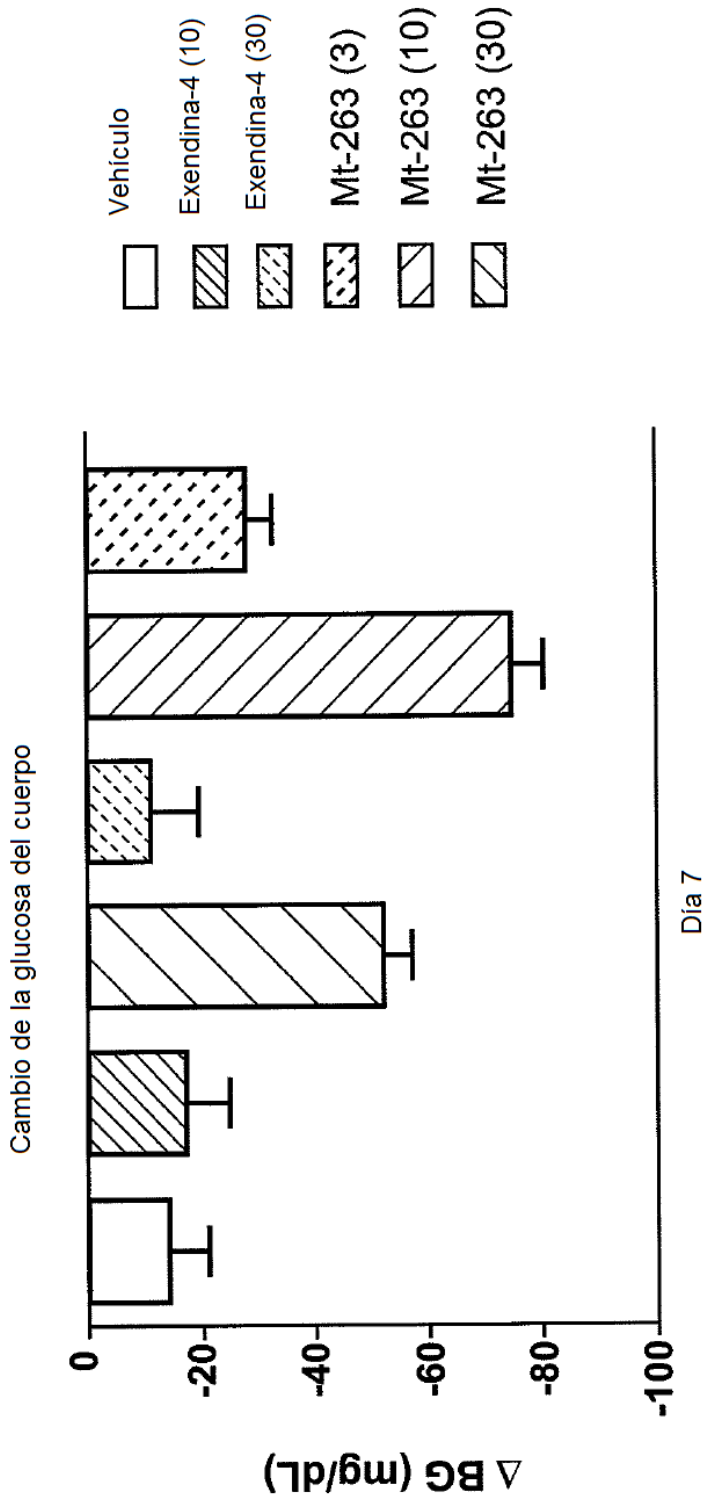




Figura 27

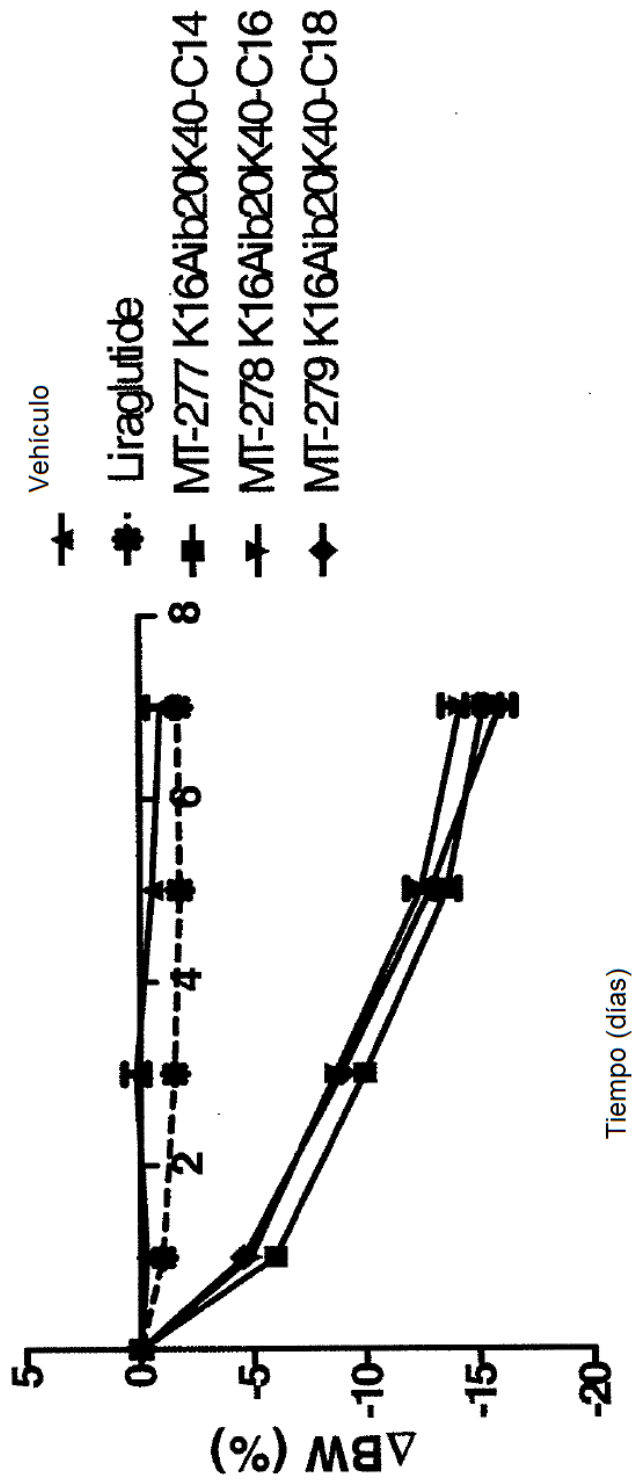


Figura 28

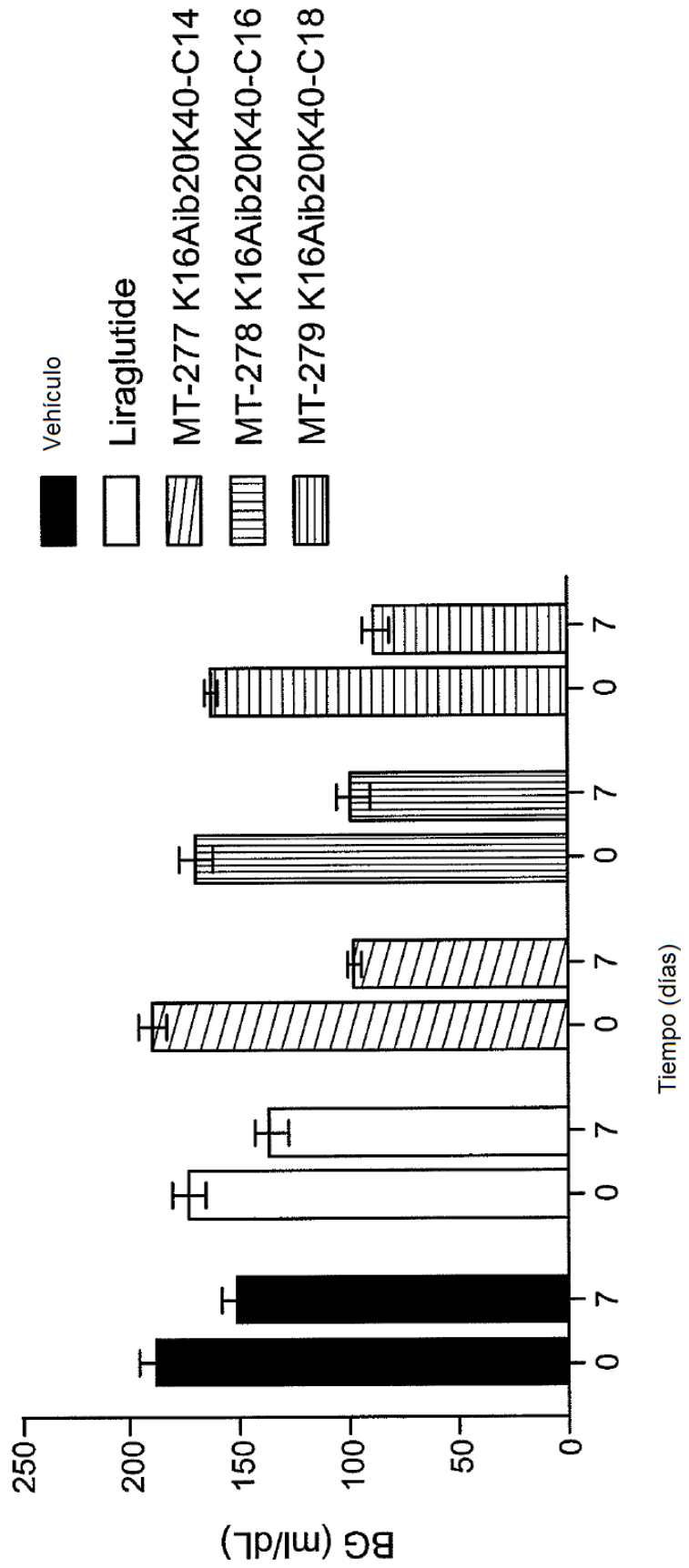


Figura 29

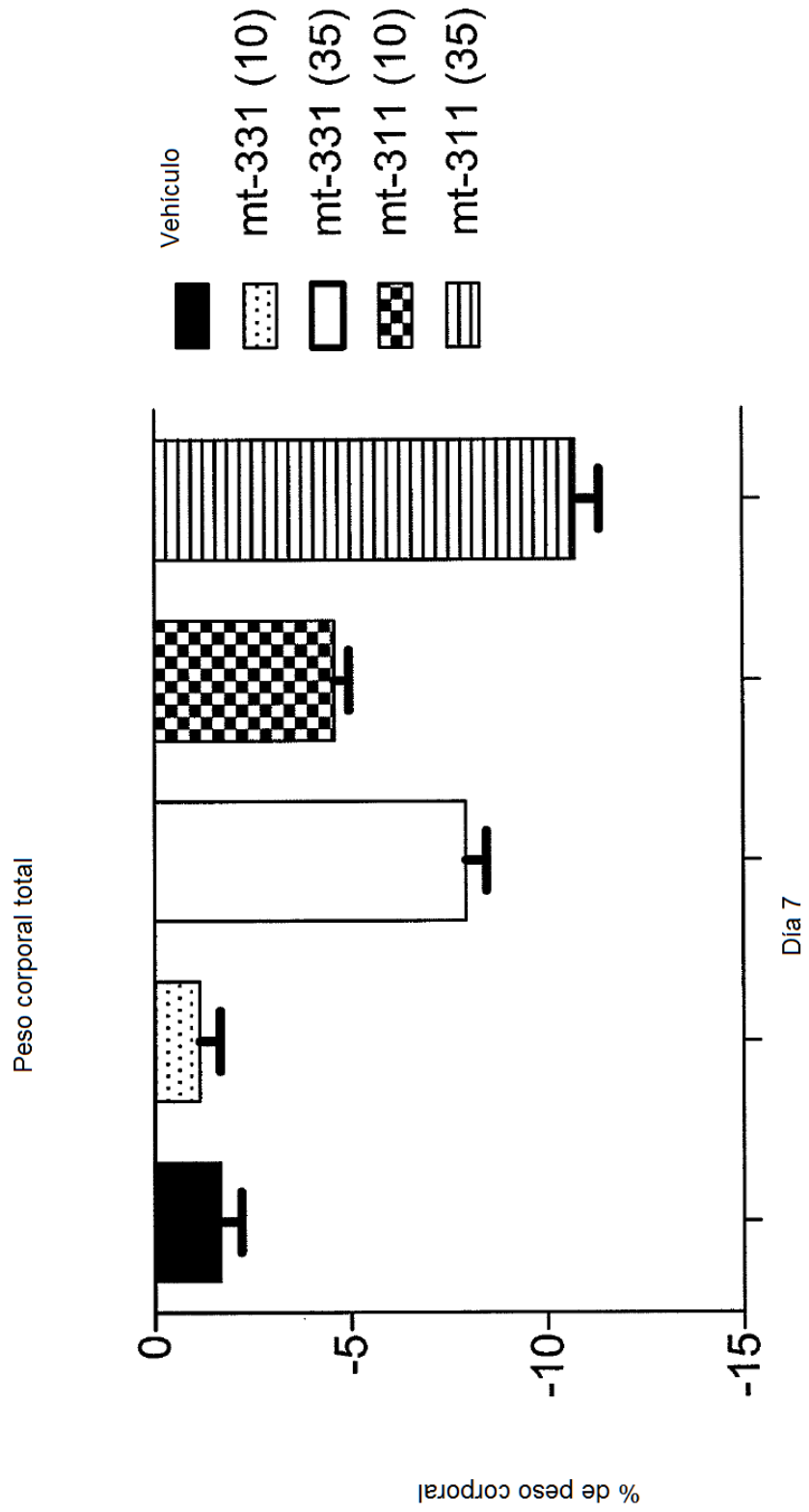


Figura 30

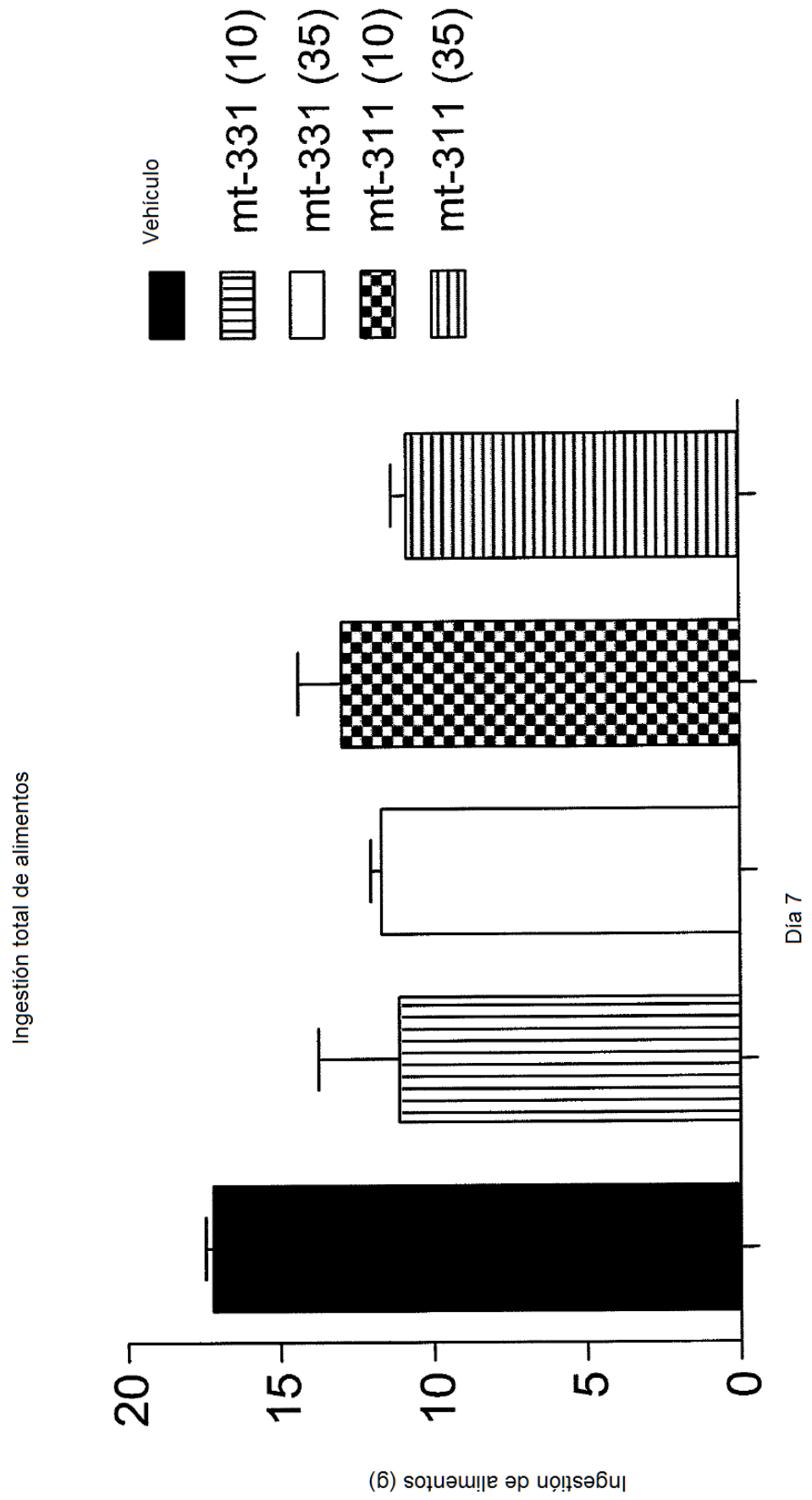


Figura 31

Cambio de la glucosa en sangre

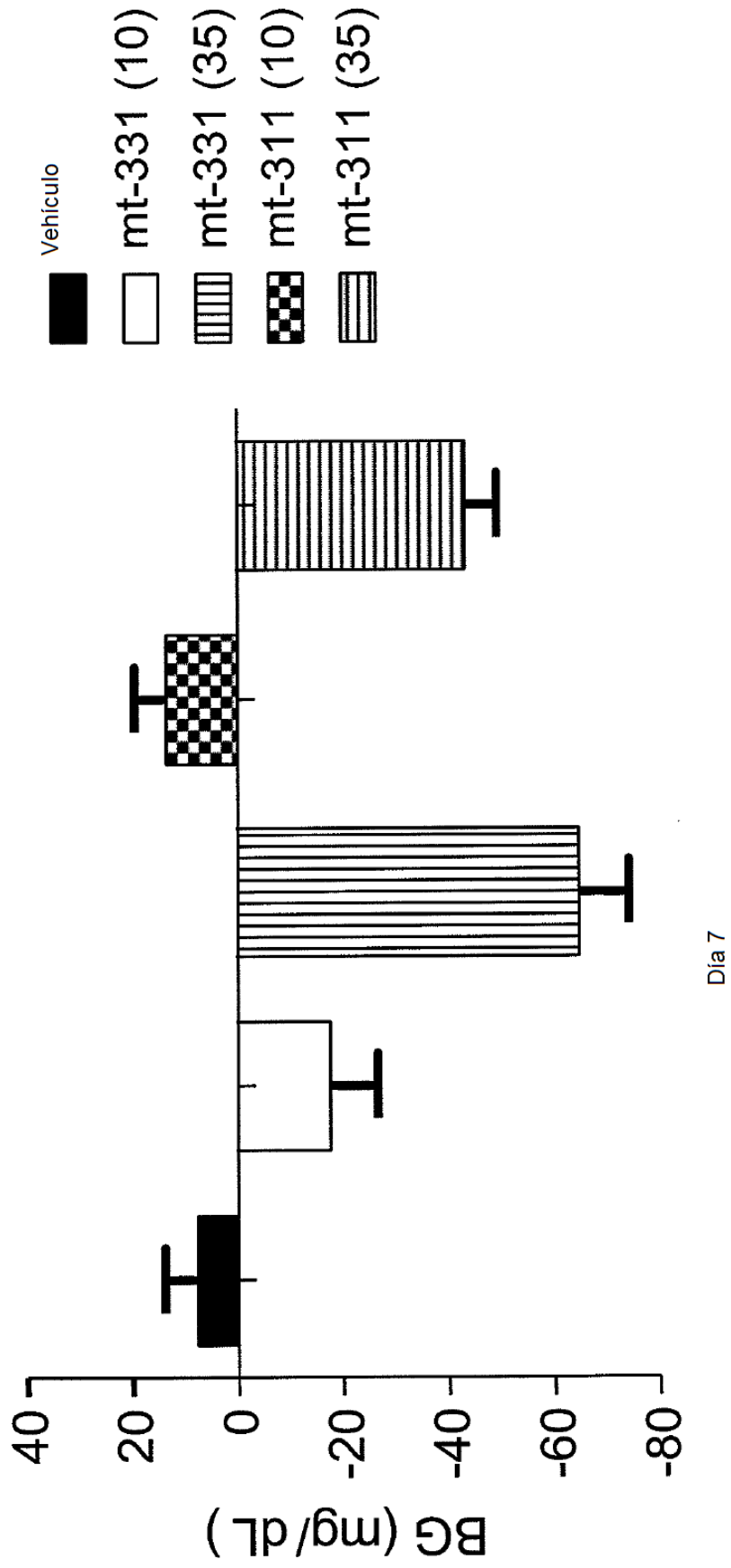


Figura 32

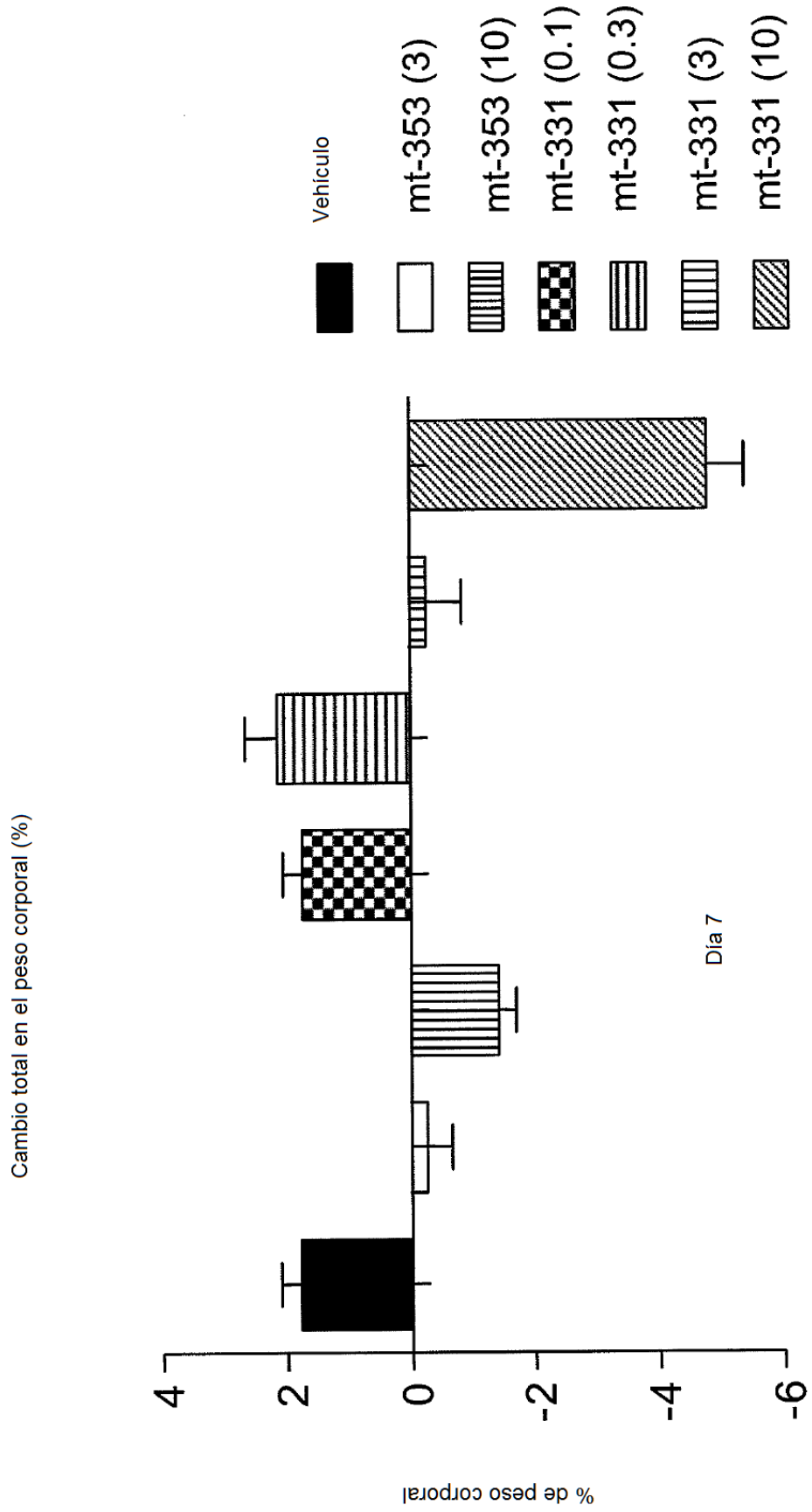


Figura 33

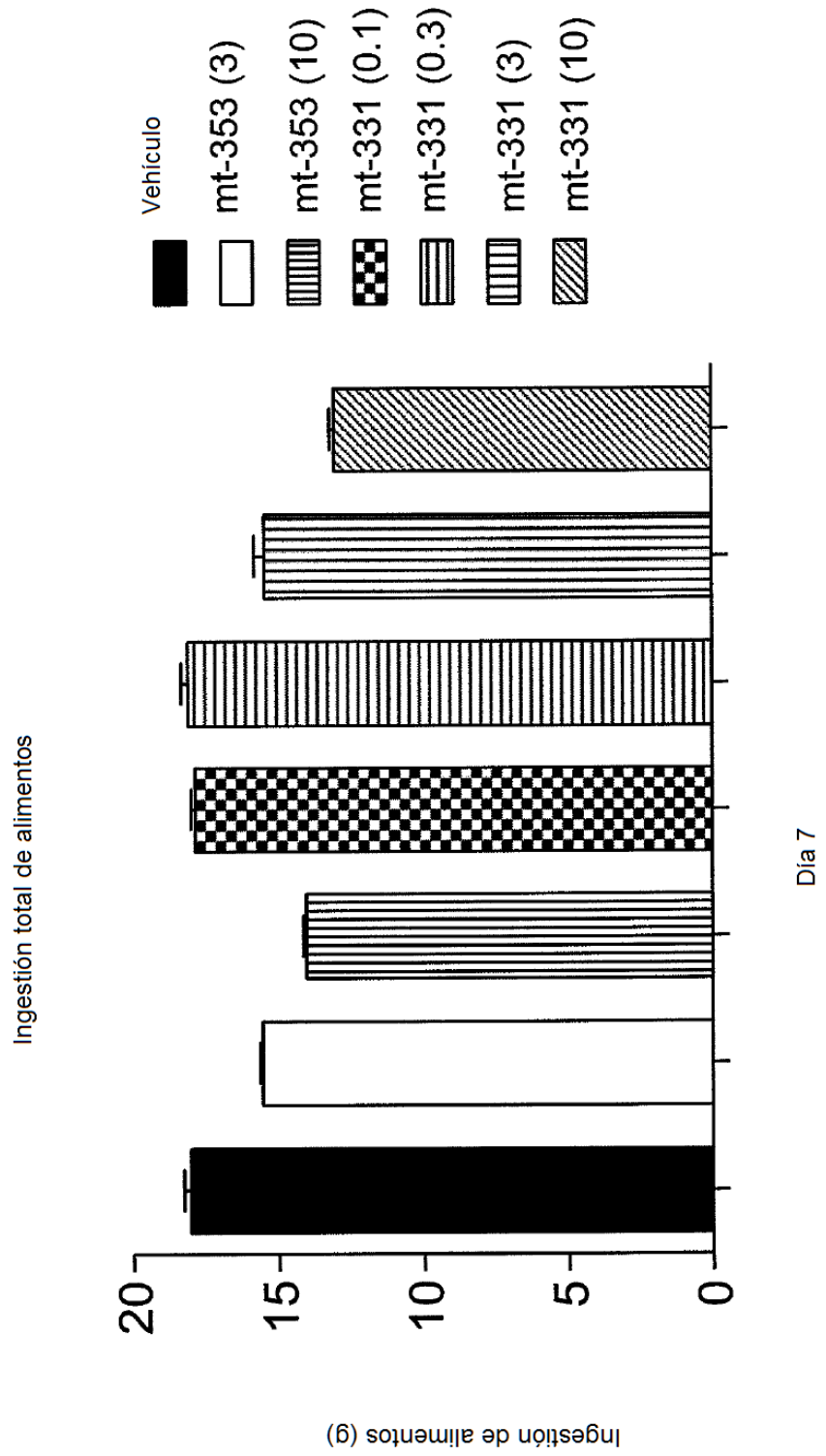


Figura 34

Cambio de la glucosa en sangre

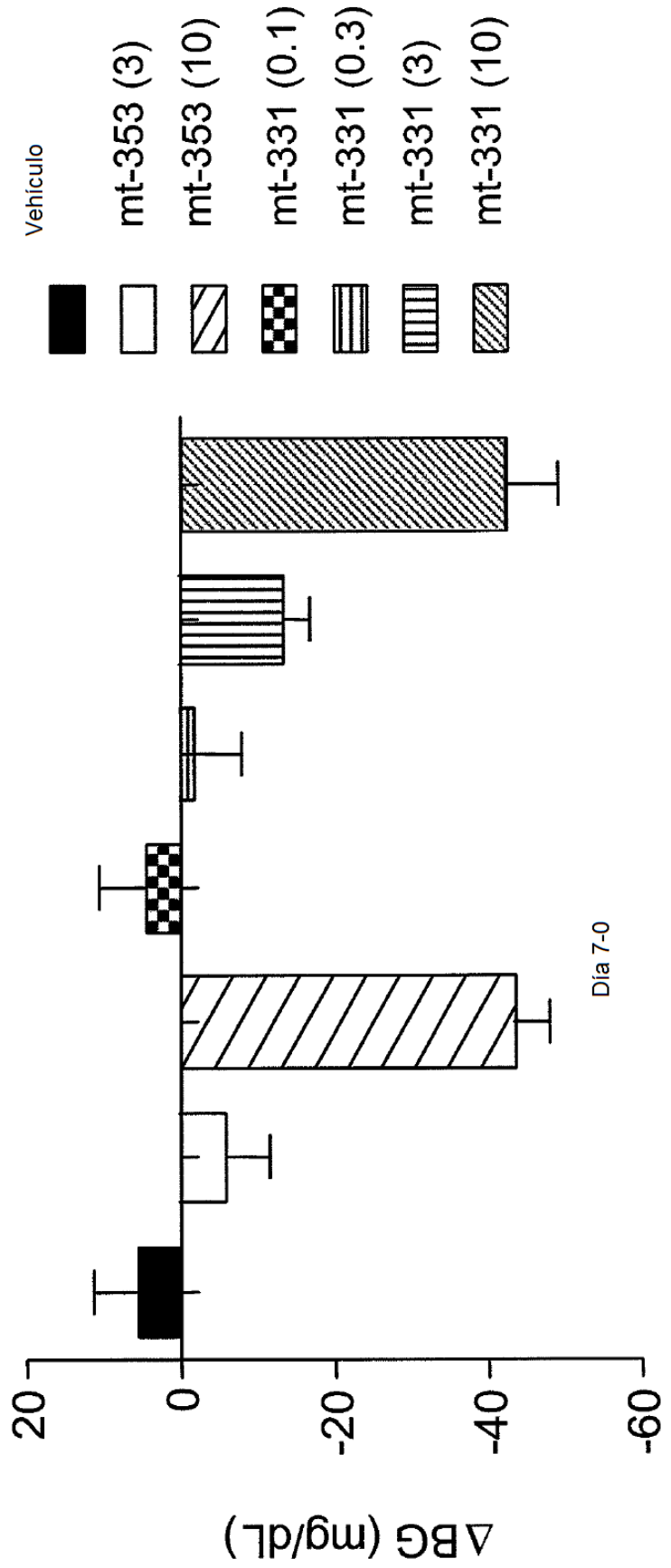




Figura 35

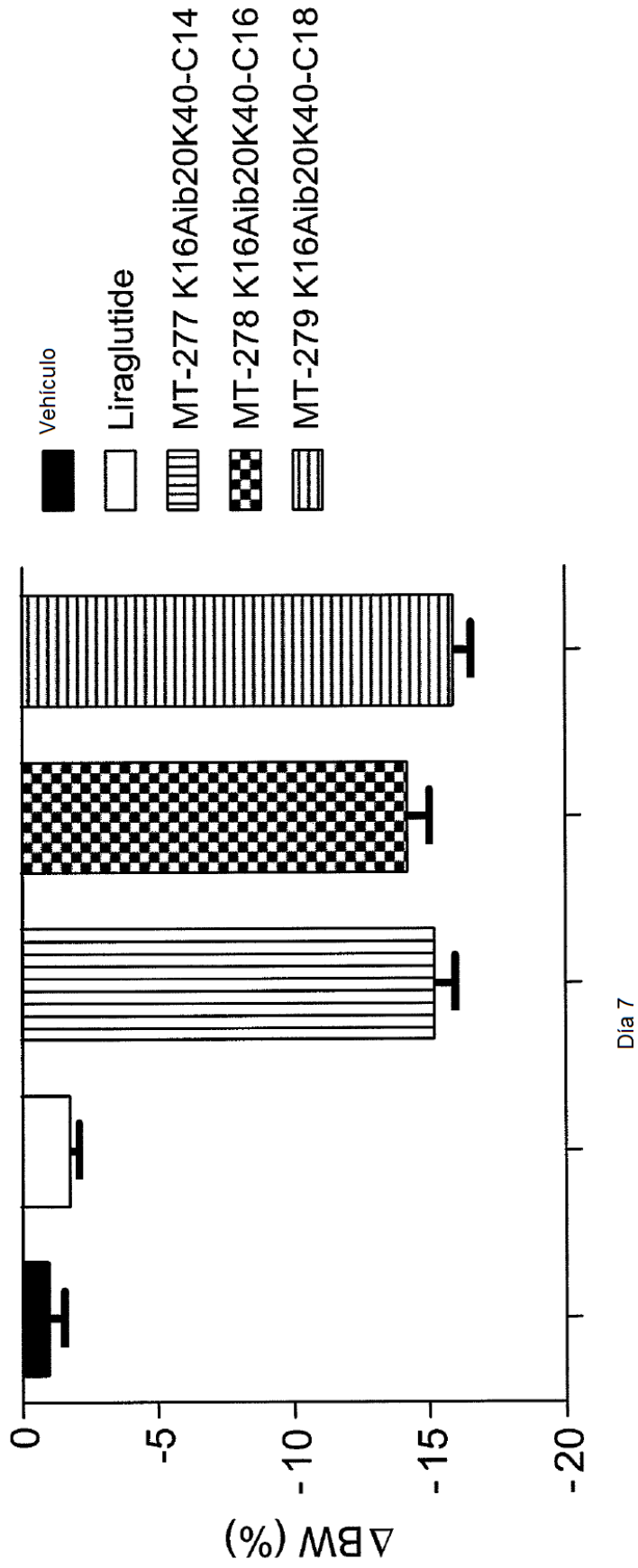


Figura 36

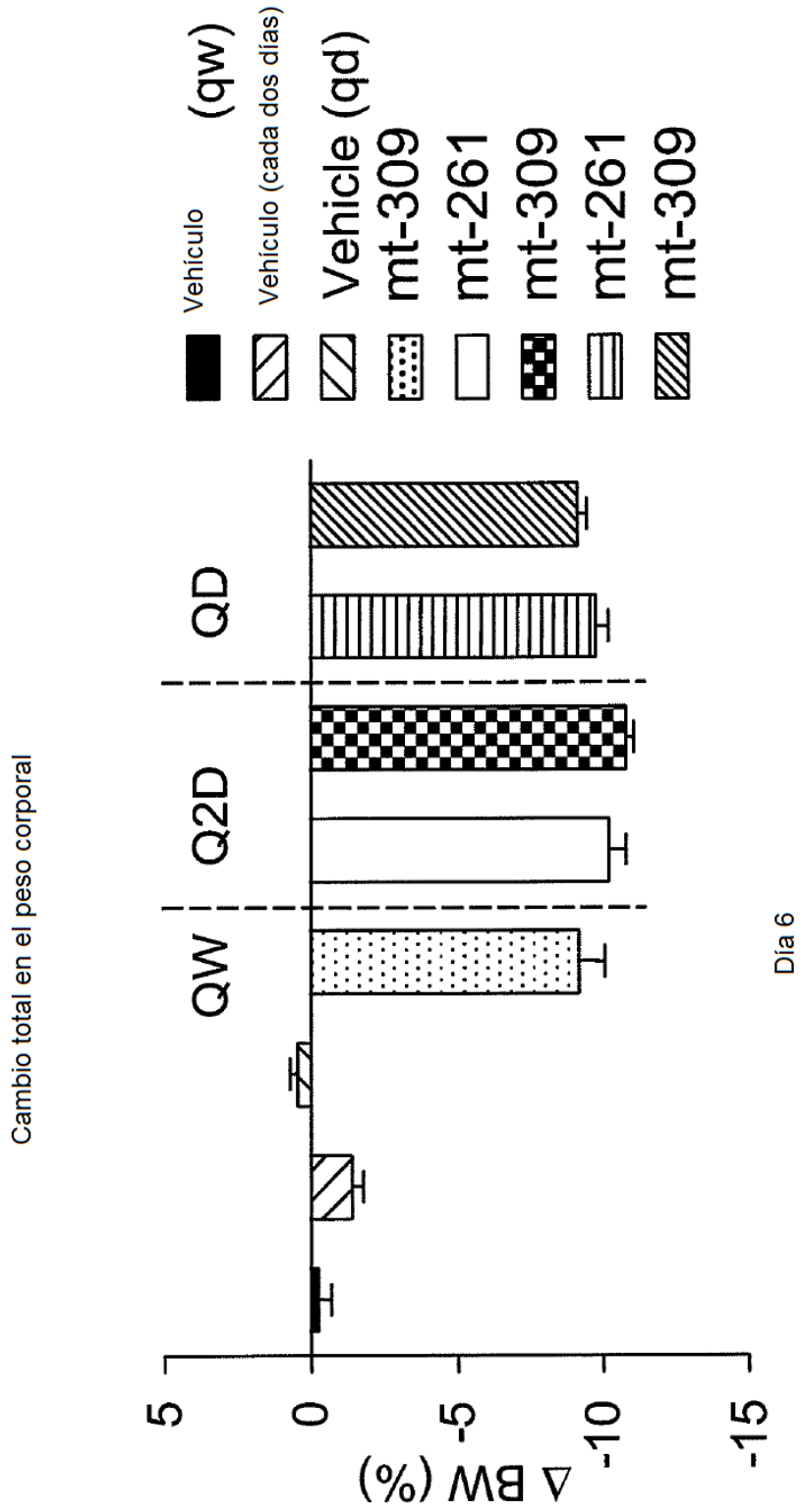


Figura 37

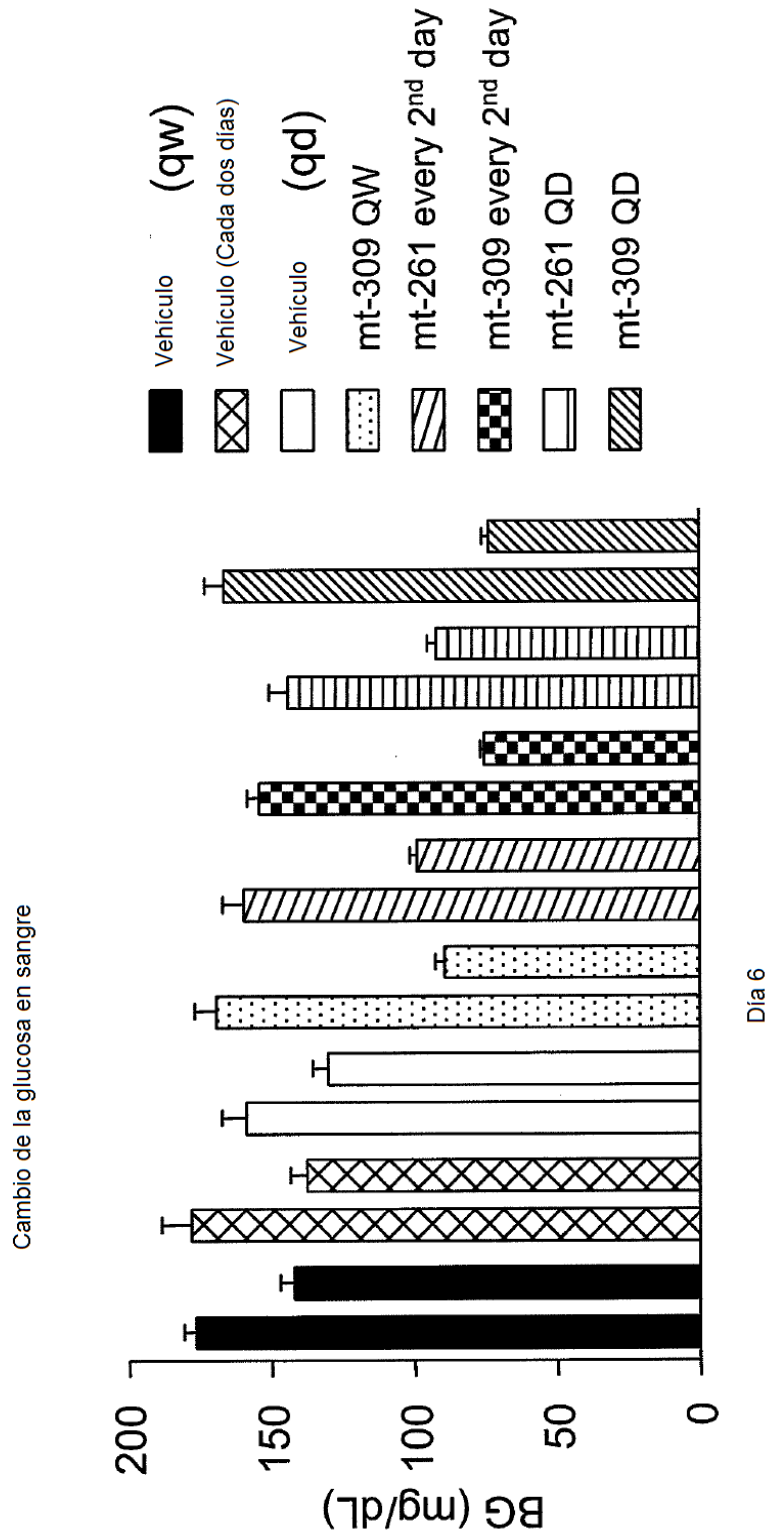


Figura 38

