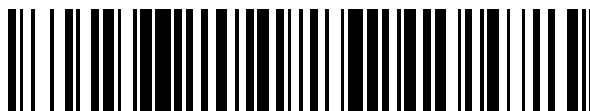


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 063**

51 Int. Cl.:

A61K 35/37 (2015.01)

A61K 35/38 (2015.01)

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.01.2008 PCT/US2008/050099**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.07.2008 WO08086086**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.01.2008 E 08713455 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.03.2017 EP 2124974**

54 Título: **Análogos de glucagón que muestran una mayor solubilidad en tampones de pH fisiológicos**

30 Prioridad:

05.01.2007 US 878919 P

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

01.08.2017

73 Titular/es:

**INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND
TECHNOLOGY CORPORATION (100.0%)
518 Indiana Avenue
Indianapolis, IN 46202, US**

72 Inventor/es:

**DIMARCHI, RICHARD, D.;
DIMARCHI, MARIA y
CHABENNE, JOSEPH**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 628 063 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Análogos de glucagón que muestran una mayor solubilidad en tampones de pH fisiológicos

5 ANTECEDENTES

10 [0001] La hipoglucemia aparece cuando los niveles de glucosa en sangre descienden demasiado bajo para proporcionar suficiente energía para las actividades del cuerpo. En los adultos o niños mayores de 10 años, la hipoglucemia es rara, excepto como un efecto secundario del tratamiento de la diabetes, pero puede ser el resultado de otros medicamentos o enfermedades, deficiencias hormonales o enzimáticas o tumores. Cuando la glucosa de la sangre comienza a disminuir, el glucagón, una hormona producida por el páncreas, señala al hígado para que descomponga el glucógeno y libere la glucosa, causando que los niveles de glucosa en sangre aumenten hacia un nivel normal. Sin embargo, para los diabéticos, esta respuesta del glucagón a la hipoglucemia puede verse afectada, lo que hace más difícil que los niveles de glucosa vuelvan al intervalo normal.

15 [0002] La hipoglucemia es un suceso potencialmente mortal que requiere atención médica inmediata. La administración de glucagón es una medicación establecida para el tratamiento de la hipoglucemia aguda y puede restaurar los niveles normales de glucosa en cuestión de minutos desde la administración. Cuando el glucagón se utiliza en el tratamiento médico agudo de la hipoglucemia, una forma cristalina de glucagón se solubiliza con un tampón ácido diluido y la solución se inyecta por vía intramuscular. Mientras que este tratamiento es eficaz, la metodología es engorrosa y peligrosa para alguien que está semiconsciente. Por consiguiente, existe una necesidad de un análogo de glucagón que mantenga la acción biológica de la molécula parental, pero que sea suficientemente soluble y estable, en condiciones fisiológicas pertinentes, para que pueda preformularse como una solución lista para la inyección.

20 [0003] Además, se sugiere que los diabéticos se mantengan cerca de los niveles normales de glucosa en sangre para retrasar o prevenir las complicaciones microvasculares. El logro de este objetivo general requiere el tratamiento intensivo con insulina. En el esfuerzo para lograr este objetivo, los médicos han encontrado un aumento sustancial de la frecuencia y la gravedad de la hipoglucemia en los pacientes diabéticos. En consecuencia, se necesitan productos farmacéuticos mejorados y metodologías para el tratamiento de la diabetes que tengan menos probabilidades de inducir hipoglucemia que los tratamientos actuales con insulina.

25 [0004] Tal como se describe en el presente documento, se proporcionan agonistas de glucagón de alta potencia que muestran una mayor estabilidad biofísica y solubilidad acuosa a pH fisiológico en composiciones farmacéuticas adecuadas para el uso comercial. El glucagón natural no es soluble, ni estable en el intervalo de pH fisiológico y por lo tanto debe ser fabricado como un producto seco que requiere la reconstitución y uso inmediato. Los análogos de glucagón descritos en este documento tienen propiedades físicas mejoradas que los hacen superiores para su uso en escenario médico actual que emplea actualmente la hormona nativa. Estos compuestos se pueden utilizar según una realización para preparar soluciones preformuladas listas para inyección para tratar la hipoglucemia. Alternativamente, los agonistas de glucagón se pueden coadministrar con la insulina para amortiguar los efectos de la insulina para permitir un mantenimiento más estable de los niveles de glucosa en sangre. Además, otros usos beneficiosos de las composiciones que comprenden los péptidos de glucagón modificados descritos en este documento se describen en detalle a continuación.

35 [0005] El documento WO 2004/105781 se refiere a un procedimiento para aumentar la vida útil de una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón, un tampón farmacéuticamente aceptable, y un conservante farmacéuticamente aceptable, en donde la composición farmacéutica se prepara a partir de un producto principalmente peptídico que ha sido sometido a un tratamiento a un pH en el intervalo de 8,1 a 9,6.

40 [0006] El documento WO 2004/105790 es similar al documento WO 2004/105781, y también está dirigido a un procedimiento para aumentar la vida útil de una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón, un tampón farmacéuticamente aceptable, y un conservante farmacéuticamente aceptable. El documento WO 2004/105790 enseña a mejorar la estabilidad de análogos de glucagón mediante la preparación de composiciones con un producto principalmente de un péptido de glucagón producido por secado de una solución o suspensión del producto de péptido que tiene un pH superior a 8,0.

45 [0007] El documento WO 2006/134340 se refiere a nuevos análogos de péptidos de oxintomodulina que reducen la ingesta de alimentos. Más particularmente, se proporcionan análogos de oxintomodulina el que los aminoácidos 15 - 24 de la oxintomodulina están sustituidos por cualquiera de los aminoácidos 968 - 977 del péptido α -latrotóxina o 15 - 24 de la exendina-4, o combinaciones de secuencias de estas regiones, y/o el cambio de los aminoácidos 27 - 33 de oxintomodulina a 27 - 33 de exendina-4, y/o la adición de aminoácidos al extremo C-terminal del péptido.

50 [0008] J. Biol Chem, 2006, Vol 281 (18) pp. 12506-1251 se refiere a una serie de péptidos híbridos compuestos de glucagón y, o bien GLP-1 o exendina-4. Se describen péptidos que funcionan como agonista del receptor GLP-1 y un antagonista del receptor de glucagón. El documento WO 2001/083527 se refiere a antagonista de glucagón que

tiene un vehículo unido a través del extremo N- o C-terminal del antagonista de glucagón. El vehículo preferido es un dominio Fc, y el dominio Fc preferido es un dominio Fc de IgG.

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

5 **[0009]** La presente invención se refiere a un péptido de glucagón con mayor solubilidad tal como se define en el juego de reivindicaciones.

10 **[0010]** La presente invención se refiere además a un multímero, dímero, heterodímero o homodímero que comprende dos péptidos de glucagón, tal como se define en el juego de reivindicaciones.

[0011] La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el péptido de glucagón, tal como se define en el juego de reivindicaciones.

15 **[0012]** La presente invención se refiere además a un kit, tal como se define en el juego de reivindicaciones.

[0013] La presente invención se refiere además a un péptido de glucagón, tal como se define en el juego de reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento de la hipoglucemia, o la inducción de la parálisis temporal del tracto intestinal.

20 **[0014]** Una realización de la invención proporciona péptidos de glucagón que retienen la actividad del receptor de glucagón y exhiben una mayor solubilidad en relación con el péptido de glucagón natural (SEQ ID NO: 1). El glucagón natural presenta una mala solubilidad en solución acuosa, particularmente a pH fisiológico, con una tendencia a agregarse y precipitar con el tiempo. En cambio, los péptidos de glucagón de una realización de la invención exhiben al menos 2 veces, 5 veces, o incluso una solubilidad más alta en comparación con el glucagón natural a un pH entre 6 y 8, por ejemplo, a pH 7 después de 24 horas a 25°C.

25 **[0015]** En una realización, los péptidos de glucagón retienen al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% de actividad, 80% de actividad, 85% de actividad, o 90% de la actividad del glucagón natural. En una realización, los péptidos de glucagón descritos en este documento tienen una potencia mayor que el glucagón. Cualquiera de los péptidos de glucagón descritos en este documento pueden presentar, además, una mayor estabilidad y/o degradación reducida, por ejemplo, reteniendo al menos el 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C.

35 **[0016]** Según una realización se proporciona un péptido de glucagón en donde el péptido está modificado por sustituciones de aminoácidos y/o adiciones que introducen un aminoácido cargado en la parte C-terminal del péptido, y en una realización en una posición C-terminal a la posición 27 de la SEQ ID NO: 1. Opcionalmente, uno, dos o tres aminoácidos cargados pueden introducirse en la parte C-terminal, y en una realización, C-terminal a la posición 27. Según una realización, el aminoácido o aminoácidos naturales en las posiciones 28 y/o 29 están sustituidos por un aminoácido cargado, y/o se añaden de uno a tres aminoácidos cargados al extremo C-terminal del péptido. En realizaciones ejemplares, uno, dos o todos de los aminoácidos cargados están cargados negativamente. Se pueden realizar modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservativas, al péptido de glucagón que aún permitan que se retenga la actividad de glucagón.

40 **[0017]** Según una realización de ejemplo, el péptido de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, o un análogo del mismo que contiene de 1 a 3 modificaciones de aminoácidos adicionales en relación con el glucagón natural, o un análogo de agonista de glucagón del mismo. La SEQ ID NO: 11 representa un péptido de glucagón modificado en el que el residuo asparagina en la posición 28 de la proteína nativa ha sido sustituido por un ácido aspártico. En otra realización el péptido de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, en la que el residuo de asparagina en la posición 28 de la proteína nativa ha sido sustituido por ácido glutámico. Otros ejemplos de realización incluyen péptidos de glucagón de las SEQ ID NOS: 24, 25, 26, 33, 35, 36 y 37.

45 **[0018]** La solubilidad de cualquiera de los compuestos anteriores se puede mejorar aún más mediante la unión de un resto hidrófilo al péptido. En una realización, el resto hidrófilo es una cadena de polietilenglicol u otro polímero soluble en agua que se une covalentemente a la cadena lateral de un residuo de aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24 de dicho péptido de glucagón. La cadena de polietilenglicol según una realización tiene un peso molecular seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. La presente invención abarca además sales farmacéuticamente aceptables de dichos agonistas de glucagón.

50 **[0019]** En otras realizaciones de ejemplo, cualquiera de los compuestos anteriores se puede modificar adicionalmente para alterar sus propiedades farmacéuticas mediante la adición de un segundo péptido al extremo carboxilo del péptido de glucagón. En una realización, un péptido de glucagón se une covalentemente a través de un enlace peptídico a un segundo péptido, en donde el segundo péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22.

[0020] En otras realizaciones de ejemplo, cualquiera de los compuestos anteriores se puede modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido en la posición 15 de la SEQ ID NO: 1 para reducir la degradación del péptido con el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos .

5 [0021] Según una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los nuevos péptidos de glucagón descritos en el presente documento, preferiblemente en 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 glucagón en una concentración de al menos 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, o superior. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones acuosas que se esterilizan y se almacenan opcionalmente dentro de varios recipientes. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un polvo liofilizado. Las composiciones farmacéuticas se pueden envasar adicionalmente como parte de un kit que incluye un dispositivo desechable para la administración de la composición a un paciente. Los recipientes o kits pueden estar marcados para su almacenamiento a temperatura ambiente o a temperatura refrigerada.

15 [0022] Según una realización de la descripción, se proporciona un procedimiento para aumentar rápidamente el nivel de glucosa o tratar la hipoglucemia usando una composición acuosa preformulada. El procedimiento comprende la etapa de administrar una cantidad eficaz de una solución acuosa que comprende un nuevo péptido de glucagón modificado de la presente descripción. En otra realización de la descripción, se proporciona un procedimiento para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal. El procedimiento comprende la etapa de administrar uno o más de los péptidos de glucagón descritos en este documento a un paciente en necesidad del mismo.

20 [0023] En aún otra realización de la descripción, se proporciona un procedimiento 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 otras realizaciones de la descripción, se proporcionan procedimientos de tratamiento de la diabetes que implican la coadministración de insulina y un péptido de glucagón de la invención.

25 [0024] Los péptidos de glucagón de ejemplo se seleccionan del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEC ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 33, en los que el aminoácido 29 del péptido de glucagón está unido a un segundo péptido a través de un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22. En una realización, el péptido de glucagón está pegilado. En una realización, el procedimiento comprende la etapa de administrar un péptido que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26, en el que una cadena de polietileno está unida covalentemente a la posición del aminoácido 21 o la posición 24.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0025]

40 La figura 1 es un gráfico de barras que representa la estabilidad de glucagón Cys²¹maleimidoPEG_{5K} a 37°C incubado durante 24, 48, 72, 96, 144 y 166 horas, respectivamente.

La figura 2 representa los datos generados a partir de análisis de HPLC de glucagón Cys²¹maleimidoPEG_{5K} a pH 5 incubado a 37°C durante 24, 72 o 144 horas, respectivamente.

45 La figura 3 representa los datos que muestran la solubilidad de análogos de glucagón (D28, E29, E30) con respecto al glucagón natural después de 60 horas a 25°C a pH de 2, 4, 5,5, 7 y 8, respectivamente.

La figura 4 representa los datos que muestran la solubilidad de los análogos de glucagón (E15D28, D28E29 y D28E30) con respecto al glucagón natural después de 24 horas a 25°C y, a continuación, 24 horas a 4°C a pH de 2, 4, 5,5 y 7, respectivamente.

50 La figura 5 representa la solubilidad máxima de los análogos de glucagón D28, D28E30 y E15, D28 después de 24 horas, pH 7 a 4°C.

La figura 6 representa los datos que muestran la inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón por los análogos de glucagón (K29 ▲, K30 ▼, y K29K30♦) con respecto al glucagón natural ■.

La figura 7 representa los datos que muestran la inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón por los análogos análogos de glucagón (D28 □, E29 △, E30 ▽, K30K31◇ y K30 ▼) con respecto al glucagón natural ■.

55 La figura 8 representa los datos que muestran la inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón por los análogos de glucagón (D28 □, E28 ● y K29, ▲) con respecto al glucagón natural ■.

La figura 9 representa los datos que muestran la inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón por los análogos de glucagón (D28E29 +, D28E30 X, E15D28 * y E29 △) con respecto al glucagón natural ■.

60 La figura 10 representa los datos que muestran el cambio en las concentraciones de glucosa en suero en perros beagle después de la administración intramuscular de glucagón y análogos de glucagón. Los animales se les administró una dosis de 0,005 mg/kg de cualquiera de glucagón, un análogo de glucagón que comprende glucagón con la secuencia de SEQ ID NO: 31 unido al extremo carboxi de glucagón (glucagon-CEX) o un análogo de glucagón que comprende una sustitución de ácido aspártico en el aminoácido 28 (glucagon-Asp28) SEQ ID NO: 11.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0026] La presente invención se refiere a un péptido de glucagón con mayor solubilidad tal como se define en el juego de reivindicaciones.

5 [0027] La presente invención se refiere además a un multímero, dímero, heterodímero o homodímero que comprende dos péptidos de glucagón, tal como se define en el juego de reivindicaciones.

[0028] La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende el péptido de glucagón, tal como se define en el juego de reivindicaciones.

10 [0029] La presente invención se refiere además a un kit, tal como se define en el juego de reivindicaciones.

[0030] La presente invención se refiere además a un péptido de glucagón, tal como se define en el juego de reivindicaciones, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para usar en el tratamiento de la hipoglucemia, o la inducción de la parálisis temporal del tracto intestinal.

DEFINICIONES

20 [0031] En la descripción y reivindicaciones de la invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones expuestas a continuación.

[0032] 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 EEUU o incluidos en la Farmacopea de los Estados Unidos para su uso en animales, incluidos los humanos.

30 [0033] 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 de ácido y/o de base en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

35 [0034] Las sales de adición de bases 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 sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

40 [0035] Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico.

45 [0036] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" incluye profilaxis del trastorno o afección específica, o alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específica y/o prevenir o eliminar dichos síntomas.

50 [0037] 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. La cantidad que es "efectiva" variará de sujeto a sujeto, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, modo de administración. 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 e la materia usando experimentación de rutina.

[0038] El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra vía, tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

60 [0039] 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 entorno nativo o natural.

65 [0040] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" no requiere una pureza absoluta; más bien, se pretende ser una definición relativa. El término "polipéptido purificado" se utiliza en el presente documento

para describir un polipéptido que se ha separado de otros compuestos que incluyen moléculas de ácido nucleico, lípidos e hidratos de carbono.

5 [0041] El término "aislado" requiere que el material referenciado se extraiga de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado.

10 [0042] Un "péptido de glucagón" tal como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier péptido que comprende, ya sea la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o cualquier análogo de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, incluyendo sustituciones, adiciones, o deleciones o modificaciones post traduccionales de aminoácidos (por ejemplo, la metilación, la acilación, ubiquitinación) del péptido, que estimula la actividad de glucagón o el receptor de GLP-1, medida por la producción de AMPc utilizando el ensayo descrito en el ejemplo 13.

15 [0043] El término "agonista de glucagón" se refiere a un complejo que comprende un péptido de glucagón que estimula la actividad del receptor de glucagón, tal como se mide por la producción de AMPc utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 13.

20 [0044] Tal como se utiliza en el presente documento un "análogo agonista de glucagón" es un péptido de glucagón que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEC ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 o un análogo de dicha secuencia que ha sido modificada para incluir una o más sustituciones conservativas de aminoácidos en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29.

25 [0045] 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 atípico o no naturales. En toda la solicitud, todas las referencias a una posición de aminoácido particular por número (por ejemplo, la posición 28) se refieren al aminoácido en esa posición en el glucagón natural (SEQ ID NO: 1) o la posición de aminoácido correspondiente en cualquier análogo del mismo. Por ejemplo, una referencia en este documento a "posición 28" significaría la posición correspondiente 27 para un análogo de glucagón en el que el primer aminoácido de la 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 que un aminoácido se ha añadido antes del extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1.

30 [0046] 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.

40 [0047] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución conservativa de aminoácidos" se define en el presente documento como los intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

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

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas:

45 Asp, Asn, Glu, Gln, ácido cisteico y ácido homocisteico;

III. Residuos polares cargados positivamente:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:

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

50 V. Residuos grandes, aromáticos:

Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

[0048] Tal como se utiliza en este documento, el término general "polietilenglicol" o "PEG", se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena ramificada o lineal, representado 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 del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. "Polietilenglicol" o "PEG" se usa en combinación con un sufijo numérico para indicar el peso molecular promedio aproximado de los mismos. Por ejemplo, PEG-5000 se refiere a polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio total de alrededor de 5.000.

60 [0049] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pegilado" y términos similares se refiere a un compuesto que ha sido modificado a partir de su estado natural mediante la unión de un polímero de polietilenglicol al compuesto. Un "péptido de glucagón pegilado" es un péptido de glucagón que tiene una cadena de PEG unida covalentemente al péptido de glucagón.

65

5 [0050] Tal como se utiliza en el presente documento, una referencia general a un péptido pretende abarcar péptidos que tiene extremos amino y carboxi modificados. Por ejemplo, una cadena de aminoácidos que comprende un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal pretende ser abarcado por una secuencia de aminoácidos que se designan los aminoácidos estándar.

10 [0051] 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 espaciamiento óptimo de las dos entidades, o pueden suministrar además un enlace lábil que permite a las dos entidades estar separadas entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, restos lábiles en medio ácido, restos lábiles en medio básico y los grupos escindibles por enzimas.

15 [0052] 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 ausente de cualquier lenguaje de calificación, abarca tanto homodímeros y heterodímeros. Un homodímero comprende dos subunidades idénticas, mientras que un heterodímero comprende dos subunidades que son diferentes, aunque las dos subunidades son sustancialmente similares entre sí.

20 [0053] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido de glucagón estabilizado por pH" se refiere a un análogo agonista de glucagón que exhibe una estabilidad y solubilidad superior, en relación con el glucagón natural, en tampones acuosos en el intervalo de pH más amplio utilizado para fines farmacológicos.

25 [0054] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido cargado" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que está cargada negativamente (es decir, desprotonada) o cargada positivamente (es decir, protonada) en solución acuosa a pH fisiológico. Por ejemplo aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico, y ácido homoglutámico, mientras que los aminoácidos cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados incluyen los aminoácidos cargados entre los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o de origen no natural.

30 [0055] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido que comprende un segundo resto ácido, incluyendo por ejemplo, un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico.

REALIZACIONES

35 [0056] Los solicitantes han descubierto que el glucagón natural puede ser modificado mediante la introducción de carga en su extremo carboxilo para mejorar la solubilidad del péptido a la vez que conserva las propiedades agonistas del péptido. La solubilidad mejorada permite la preparación y almacenamiento de soluciones de glucagón a pH casi neutro. La formulación de soluciones de glucagón a valores de pH relativamente neutro (por ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0) mejora la estabilidad a largo plazo de los péptidos de glucagón. Por consiguiente, una realización de la presente invención está dirigida a un agonista de glucagón que ha sido modificado con respecto al péptido de tipo salvaje de His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Met-Leu-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1) para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas, en particular a un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, mientras que conserva la actividad biológica del péptido natural. En una realización, se añade la carga al péptido por la sustitución de aminoácidos no cargados naturales por aminoácidos cargados seleccionados del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico, o por la adición de aminoácidos cargados al extremo amino o carboxi terminal del péptido. Sorprendentemente, los solicitantes han descubierto que sustituyendo el aminoácido natural en la posición 28 y/o 29 por aminoácidos cargados, y/o la adición de uno a dos aminoácidos cargados en el extremo carboxilo del péptido de glucagón, mejora la solubilidad y estabilidad de los péptidos de glucagón en soluciones acuosas a pH fisiológicamente relevantes (es decir, un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5) por al menos 5 veces y por como mucho 30 veces.

55 [0057] Por consiguiente, los péptidos de glucagón de una realización de la invención retienen la actividad glucagón y exhiben al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o mayor solubilidad relativa al glucagón natural a un pH dado entre aproximadamente 5,5 y 8, por ejemplo, pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C. Cualquiera de los péptidos de glucagón descritos en este documento pueden presentar, además, una estabilidad mejorada a un pH dentro del intervalo de 5,5 a 8, por ejemplo, retienen al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Los péptidos de glucagón pueden incluir modificaciones adicionales que alteran sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo, aumento de potencia, vida media prolongada en la circulación, aumento de la vida útil, reducción de la precipitación o agregación, y/o reducción de la degradación, por ejemplo, menor aparición de escisiones o modificación química después de almacenamiento.

65 [0058] En una realización, un péptido de glucagón con solubilidad mejorada se puede preparar, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más aminoácidos cargados en la parte C-terminal de glucagón natural, y en una realización en una posición C-terminal a la posición 27. Dicho aminoácido cargado se puede introducir, por ejemplo mediante la sustitución de un aminoácido natural 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 los aminoácidos cargados están cargados positivamente. En ejemplos de realización específicas, el péptido de glucagón puede comprender uno o dos de las siguientes modificaciones: sustitución de N28 por E; sustitución de N28 por D; sustitución de T29 por D; sustitución de T29 por E; inserción de E después de la posición 27, 28 o 29; inserción de D después de la posición 27, 28 o 29. Por ejemplo, E28E30, D28E30

[0059] Las modificaciones adicionales pueden realizarse al péptido de glucagón que puede aumentar aún más la solubilidad y/o estabilidad y/o actividad de glucagón. El péptido de glucagón puede comprender alternativamente otras modificaciones que no afectan sustancialmente la solubilidad o estabilidad, y que no disminuyen sustancialmente la actividad de glucagón. 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 relativas a la secuencia de glucagón natural.

[0060] Las modificaciones de ejemplo incluyen:
sustituciones conservativas, por ejemplo, sustituciones conservativas en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29;
modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, por sustitución por ácido glutámico, ácido homocisteico, ácido cisteico o ácido homocisteico, lo que puede reducir la degradación;
adición de un resto hidrófilo tal como el polímero soluble en agua polietilenglicol, como se describe en el presente documento, por ejemplo en la posición 16, 17, 20, 21, 24 o 29, lo que puede aumentar la solubilidad y/o la vida media;
modificación del aminoácido en la posición 27, por ejemplo, por sustitución por metionina, leucina o norleucina;
modificaciones en la posición 1 o 2 como se describe en el presente documento;
extensiones C-terminales como se describe en el presente documento;
homodimerización o heterodimerización como se describe en este documento; y combinaciones de las anteriores.

[0061] Según una realización, el péptido de glucagón natural de la SEQ ID NO: 1 se modifica por la sustitución del aminoácido natural en la posición 28 y/o 29 por un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) y opcionalmente la adición de un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) al extremo carboxilo del péptido. En una realización alternativa el péptido de glucagón natural de la SEQ ID NO: 1 se modifica por la sustitución del aminoácido natural en la posición 29 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) y opcionalmente la adición de uno o dos aminoácidos cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en el extremo carboxilo del péptido. Según una realización, se proporciona un análogo de glucagón que tiene una mejor solubilidad y estabilidad en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 34 con la condición de que al menos uno de los aminoácidos en la posición, 28, o 29 está sustituido por un aminoácido ácido y/o un aminoácido ácido adicional en el extremo carboxilo de la SEQ ID NO: 34. En una realización, los aminoácidos ácidos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico.

[0062] Según una realización, se proporciona un antagonista del glucagón que tiene mejor solubilidad y estabilidad en el que el agonista comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 33, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 27, 28 o 29 está sustituido por un residuo de aminoácido no natural (es decir, al menos un aminoácido presente en la posición 27, 28 o 29 del análogo es un aminoácido ácido diferente del aminoácido presente en la posición correspondiente en SEQ ID nO: 1). Según una realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 28 es asparagina y el aminoácido en la posición 29 es treonina, el péptido comprende además de uno a dos aminoácidos, seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu, añadidos al extremo carboxilo del péptido de glucagón.

[0063] Se ha descrito que ciertas posiciones de la péptido de glucagón natural pueden ser modificadas a la vez que conserva al menos parte de la actividad del péptido parental. Por consiguiente, los solicitantes prevén que uno o más de los aminoácidos localizados en las posiciones en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27 o 29 del péptido de la SEQ ID NO: 11 puede ser sustituido por un aminoácido diferente del presente en el péptido de glucagón natural, y aún conserva la potencia mejorada, la estabilidad de pH fisiológico y actividad biológica del péptido de glucagón parental. Por ejemplo, según una realización, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido natural se cambia a leucina o norleucina para evitar la degradación oxidativa del péptido.

[0064] En una realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 33 en el que de 1 a 6 aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 24 del análogo difieren de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Según otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 33 en el que 1 a 3 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 24 del análogo difieren de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 34 en el que 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 24 del

análogo difieren de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en una realización adicional dichos uno a dos diferentes aminoácidos representan sustituciones conservativas de aminoácidos en relación con el aminoácido presente en la secuencia natural (SEQ ID NO: 1). En una realización, se proporciona un péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO 13 en el que el péptido de glucagón comprende además uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27 o 29. En una realización, las sustituciones en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 27 o 29 son sustituciones conservativas de aminoácidos.

[0065] En una realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 1 en el que el análogo difiere de SEQ ID NO: 1 por tener un aminoácido distinto de serina en la posición 2 y por tener un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido natural en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxilo del péptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización, el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico. En una realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 32 en el que el análogo difiere de la molécula parental por una sustitución en la posición 2. Más particularmente, la posición 2 del péptido análogo está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, alanina, glicina, n-metil serina y ácido aminoisobutírico.

[0066] En otra realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 1 en el que el análogo difiere de la SEQ ID NO: 1 por tener un aminoácido distinto de histidina en la posición 1 y por tener un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido natural en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxilo del péptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización, el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico. En una realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 32 en el que el análogo difiere de la molécula parental por una sustitución en la posición 1. Más particularmente, la posición 1 del péptido análogo está sustituida por un aminoácido seleccionado de entre el grupo que consiste en D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina.

[0067] Según una realización, el péptido de glucagón modificado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 32. En una realización adicional se proporciona un péptido de glucagón que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 32 que comprende además uno o dos aminoácidos añadidos al extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 32, en el que los aminoácidos adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico. En una realización, los aminoácidos adicionales añadidos al extremo carboxilo se seleccionan del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu o en una realización adicional, los aminoácidos adicionales son Asp o Glu.

[0068] En otra realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 o un análogo agonista de glucagón del mismo. En una realización, el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. En otra realización, el péptido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11. En una realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 que comprende además un aminoácido adicional, seleccionado del grupo que consiste en Asp y Glu, añadido al extremo C-terminal del péptido de glucagón. En una realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, y en una realización adicional el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11.

[0069] Según una realización, se proporciona un agonista del glucagón que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en:

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 34),

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R (SEQ ID NO: 11) y

NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Glu-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R (SEQ ID NO: 13)

en las que Xaa en la posición 15 es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, Xaa en la posición 28 es Asn o un aminoácido ácido y Xaa en la posición 29 es Thr o un aminoácido ácido y R es un aminoácido ácido, COOH o CONH₂, con la condición de que un residuo de ácido ácido está presente en una de las posiciones 28, 29 o 30. En una realización R es COOH, y en otra realización R es CONH₂.

[0070] La presente descripción también abarca péptidos de fusión de glucagón en los que un segundo péptido se ha fusionado con el extremo C-terminal del péptido de glucagón para mejorar la estabilidad y solubilidad del péptido de glucagón. Más particularmente, el péptido de glucagón de fusión puede comprender un análogo agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 34), en el que R es un aminoácido ácido o un enlace y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21

(KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNRR) unida al aminoácido carboxi terminal del péptido de glucagón. En una realización el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 8 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNRR) unida al aminoácido carboxi terminal del péptido de glucagón. En una realización, el péptido de fusión de glucagón comprende la SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6 o un análogo agonista de glucagón de la misma, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNRR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. Según una realización, el péptido de fusión comprende además una cadena de PEG unida a un aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24, en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. En una realización, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNRR) está unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón a través de un enlace peptídico. En una realización, la parte de péptido de glucagón del péptido de fusión de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13. En una realización, la parte de péptido de glucagón del péptido de fusión de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, en el que una cadena de PEG está unida en la posición 21 o 24, respectivamente.

[0071] En otra realización, la secuencia del péptido de glucagón del péptido de fusión comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRRNNIA) o SEC ID NO: 22 (KRNRR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. En una realización, el péptido de fusión de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26. Típicamente, los péptidos de fusión descritos en este documento tendrán un aminoácido C-terminal con el grupo de ácido carboxílico estándar. Sin embargo, los análogos de las secuencias en los que el aminoácido C-terminal tiene una amida sustituida por el ácido carboxílico también se incluyen como realizaciones. Según una realización, el péptido de glucagón de fusión comprende un análogo agonista de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 (GPSSGAPPPS-CONH 2) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón.

[0072] Los agonistas de glucagón de la presente invención se pueden modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad y la estabilidad del péptido en soluciones acuosas a la vez que conserva la actividad biológica del péptido de glucagón. Según una realización, la introducción de grupos hidrófilos en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido de la SEQ ID NO: 11, o un análogo agonista de glucagón del mismo, se prevé que mejoren la solubilidad y la estabilidad del pH que estabilizan el análogo de glucagón. Más particularmente, en una realización, el péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, o SEQ ID NO: 32 se modifica para comprender uno o más grupos hidrófilos unidos covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos presentes en las posiciones 21 y 24 del péptido de glucagón.

[0073] Según una realización, el péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 11 se modifica para contener una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y/o 29, donde el ácido amino nativo es sustituido por un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo por ejemplo, PEG. El péptido natural puede estar sustituido por un aminoácido de origen natural o sintético (de origen no natural) de aminoácidos. Los aminoácidos sintético o de origen no natural se refieren a aminoácidos que no son naturales in vivo pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas en el presente documento.

[0074] En una realización, se proporciona un agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 en el que la secuencia del péptido de glucagón natural se ha modificado para contener un aminoácido de origen natural o sintético en al menos una de las posiciones 16, 17, 21 y 24 de la secuencia nativa, en el que el sustituto de aminoácido comprende además un resto hidrófilo. En una realización, la sustitución es en la posición 21 o 24, y en una realización adicional el resto hidrófilo es una cadena de PEG. En una realización el péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 11 está sustituido con al menos un residuo de cisteína, en el que la cadena lateral del residuo de cisteína se modifica adicionalmente con un reactivo reactivo con tiol, incluyendo, por ejemplo, maleimido, vinil sulfona, 2-piridiltio, haloalquilo, y haloacilo. Estos reactivos que reaccionan con tiol pueden contener grupos carboxi, ceto, hidroxilo y éter, así como otros restos hidrófilos, tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, el péptido de glucagón natural se sustituye con lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina sustituyente se modifica adicionalmente utilizando reactivos que reaccionan con amina, tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc) de ácidos carboxílicos o aldehídos de restos hidrófilos, tales como polietilenglicol. En una realización, el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19.

[0075] Según una realización, el péptido de glucagón pegilado comprende dos o más cadenas de polietileno unidas covalentemente al péptido de glucagón en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización, el agonista del glucagón pegilado comprende un péptido de la SEQ ID NO: 6, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en el que el peso molecular combinado de los dos cadenas de

PEG es de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 Daltons. En otra realización, el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido de la SEQ ID NO: 6, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 Daltons.

[0076] El polietilenglicol puede estar en forma de una cadena lineal o puede estar ramificada. Según una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular promedio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Daltons. En otra realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0077] Tal como se describe en detalle en los Ejemplos, los agonistas de glucagón de la presente invención tienen una estabilidad biofísica y solubilidad acuosa en soluciones de pH fisiológica mejoradas, mientras que conserva o demuestra una mayor bioactividad con relación al péptido natural. Por consiguiente, los agonistas de glucagón de la presente invención se cree que son adecuados para cualquier uso que ha sido previamente descrito para el péptido de glucagón natural. Por lo tanto, los péptidos de glucagón modificados descritos en el presente documento se pueden usar para tratar la hipoglucemia, para aumentar el nivel de glucosa en sangre, para inducir la parálisis temporal del intestino para usos radiológicos, para reducir y mantener el peso corporal, como terapia adyuvante con la insulina, o para tratar otras enfermedades metabólicas que dan lugar a bajos niveles en sangre de glucagón.

[0078] Un aspecto de la presente descripción se refiere a una solución acuosa preformulada del agonista de glucagón descrito en el presente documento para usar en el tratamiento de la hipoglucemia. La estabilidad y/o solubilidad mejorada de las composiciones agonistas descritas en este documento permiten la preparación de soluciones acuosas preformuladas de glucagón para la administración y el tratamiento rápido de la hipoglucemia. Por consiguiente, en una realización se proporciona una solución que comprende un agonista de glucagón de la presente invención para usar en la administración a un paciente que sufre de hipoglucemia. En una realización se proporciona una solución que comprende un agonista de glucagón pegilado tal como se describe en el presente documento para la administración a un paciente que sufre de hipoglucemia, en el que el peso molecular total de las cadenas de PEG unidas al agonista de glucagón pegilado es de entre aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Daltons. En una realización, el antagonista del glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, y análogos de agonistas de glucagón de los mismos, en el que la cadena lateral de un residuo de aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24 de dicho péptido de glucagón se une covalentemente a la cadena de polietilenglicol. En una realización, el agonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 16, en el que el residuo de aminoácido en la posición 21 del péptido está unido covalentemente a polietilenglicol. En una realización, el agonista de glucagón pegilado comprende el péptido de SEQ ID NO: 17, en el que el residuo de aminoácido en la posición 24 del péptido está unido covalentemente a polietilenglicol.

[0079] El procedimiento de tratamiento de la hipoglucemia tal como se describe en el presente documento comprende las etapas de administrar los agonistas de glucagón descritos en el presente documento a un paciente utilizando cualquier vía habitual de administración, incluyendo parenteral, tal como intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, por vía oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y la composición de glucagón se envasa previamente en una jeringa. Ventajosamente, los análogos de glucagón estable acuosos descritos en este documento presentan una estabilidad y una solubilidad superior en tampones acuosos en el intervalo de pH más amplio utilizado para fines farmacológicos, en relación con el glucagón natural. El uso de los análogos de glucagón estabilizados descritos en este documento permite la preparación y almacenamiento de soluciones de agonistas de glucagón a pH fisiológico durante largos períodos de tiempo.

[0080] Los solicitantes han descubierto que se pueden preparar péptidos de glucagón pegilados que retienen la bioactividad y la especificidad del péptido parental. Sin embargo, aumentando la longitud de la cadena de PEG, o uniendo múltiples cadenas de PEG al péptido, de manera que el peso molecular total del PEG unido sea mayor que 5.000 Daltons, se comienza a retrasar el tiempo de acción del glucagón modificado. Según una realización, se proporciona un péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, o un análogo agonista de glucagón del mismo, en el que el péptido comprende una o más cadenas de polietilenglicol, en el que el peso molecular total del PEG unido es mayor que 5.000 Daltons, y en una realización es mayor que 10.000 Daltons, pero menor de 40.000 Daltons. Tales péptidos de glucagón modificados tienen un tiempo de retraso de la actividad pero sin pérdida de la bioactividad. Por consiguiente, tales compuestos se pueden administrar profilácticamente para alargar el efecto del péptido de glucagón administrado.

[0081] Los péptidos de glucagón que han sido modificados para unirse covalentemente a una cadena de PEG que tiene un peso molecular mayor de 10.000 Daltons se pueden administrar en combinación con la insulina para amortiguar las acciones de la insulina y ayudar a mantener los niveles de glucosa en la sangre estable en los diabéticos. Los péptidos de glucagón modificados de la presente descripción se pueden administrar conjuntamente

con la insulina como una sola composición, administrarse simultáneamente como soluciones separadas, o alternativamente, la insulina y el péptido de glucagón modificado se pueden administrar en diferentes tiempos uno respecto al otro. En una realización, la composición que comprende la insulina y la composición que comprende el péptido de glucagón modificado se administran en 12 horas uno del otro. La proporción exacta del péptido de glucagón modificado con relación a la insulina administrada dependerá en parte en la determinación de los niveles de glucagón del paciente, y puede determinarse mediante experimentación rutinaria.

[0082] Según una realización, se proporciona una composición que comprende la insulina y un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y el análogos de agonistas de glucagón del mismo, en el que el péptido de glucagón modificado comprende además una cadena de polietilenglicol unida covalentemente a una cadena lateral de aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24. En una realización, la composición es una solución acuosa que comprende la insulina y el análogo de glucagón. En realizaciones en las que el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, el péptido puede comprender además una cadena de polietilenglicol unida covalentemente a una cadena lateral de aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24. En una realización, el peso molecular de la cadena de PEG del péptido de glucagón modificado es mayor que 10.000 Daltons. En una realización el péptido de glucagón pegilado comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13 en el que la cadena lateral de un residuo de aminoácido en la posición 21 o 24 de dicho péptido de glucagón se une covalentemente a la cadena de polietilenglicol. En una realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000.

[0083] Según una realización, los péptidos de glucagón modificados descritos en este documento se usan para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal. Este procedimiento tiene utilidad para fines radiológicos y comprende el paso de administrar una cantidad eficaz de una composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón pegilado, un péptido de glucagón que comprende una extensión C-terminal o un dímero de tales péptidos. En una realización, el péptido de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. En una realización, el péptido de glucagón comprende además una cadena de PEG, de aproximadamente 1.000 a 40.000 Daltons unida covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 21 o 24. En una realización, el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17. En una realización, la cadena de PEG tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Daltons.

[0084] En una realización adicional, la composición usada para inducir la parálisis temporal del tracto intestinal comprende un primer péptido de glucagón modificado y un segundo péptido de glucagón modificado, en el que el primer péptido modificado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, opcionalmente unidos a una cadena de PEG de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Daltons, y el segundo péptido comprende una cadena de PEG unida covalentemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Daltons. En esta realización, la cadena de PEG de cada péptido se une covalentemente a un residuo de aminoácido en cualquiera de las posiciones 21 o 24 del péptido respectivo, e independiente uno del otro.

[0085] Se ha descrito que la oxintomodulina, una hormona digestiva natural que se encuentra en el intestino delgado, causa la pérdida de peso cuando se administra a ratas o humanos (véase Diabetes 2005; 54: 2390-2395). La oxintomodulina es un péptido de 37 aminoácidos que contiene la secuencia de 29 aminoácidos de glucagón (es decir, SEQ ID NO: 1), seguido de una extensión carboxi terminal de 8 aminoácidos de la SEQ ID NO: 23 (KRNRNNIA). Por consiguiente, los solicitantes creen que la bioactividad de la oxintomodulina puede ser retenida (es decir, supresión del apetito y pérdida de peso/mantenimiento de peso inducido), a la vez que mejora la solubilidad y estabilidad del compuesto y la mejora de la farmacocinética, mediante la sustitución de la porción de péptido de glucagón de oxintomodulina por los péptidos de glucagón modificados descritos en este documento. Además, los solicitantes también creen que una molécula de oxintomodulina troncada que comprende un péptido de glucagón tal como se describe en el presente documento, que tiene los cuatro aminoácidos terminales de oxintomodulina eliminados, también será eficaz en la supresión del apetito y la inducción del mantenimiento del peso/pérdida de peso.

[0086] Por consiguiente, la presente invención también abarca los péptidos modificados de glucagón de la presente invención que tienen una extensión carboxi terminal de la SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 22. Según una realización, un análogo agonista de glucagón de SEQ ID NO: 33, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 22 unidas al aminoácido 29 del péptido de glucagón, se administran a individuos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso. Según una realización, un análogo agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 22 unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón, se administra a individuos para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso. En otra realización, un procedimiento para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso en un individuo que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID

NO: 5, en el que el aminoácido 29 del péptido de glucagón se une a un segundo péptido a través de un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 24 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 25, y en el que una cadena de PEG de aproximadamente 1.000 a 40.000 Daltons se une covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 21 y/o 24. En una realización, el segmento de péptido de glucagón del agonista de glucagón se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, en el que una cadena de PEG de aproximadamente 1.000 a 40.000 Daltons se une covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 17, 21 o 24.

[0087] La exendina-4, es un péptido compuesto por 39 aminoácidos. Es un potente estimulador de un receptor conocido como GLP-1. También se ha descrito que este péptido suprime el apetito e induce la pérdida de peso. Los solicitantes han encontrado que la secuencia terminal de la exendina-4 cuando se añade en el extremo carboxi de glucagón mejora la solubilidad y la estabilidad del glucagón sin comprometer la bioactividad de glucagón. En una realización, los diez aminoácidos terminales de la exendina-4 (es decir, la secuencia de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS)) están unidos al extremo carboxi de un péptido de glucagón de la presente descripción. Estas proteínas de fusión se prevé que tengan actividad farmacológica para la supresión del apetito y la inducción del mantenimiento del peso/pérdida de peso. En una realización, el aminoácido terminal de la extensión de SEQ ID NO: 20 comprende un grupo amida en lugar del grupo carboxi (es decir, SEQ ID NO: 23) y esta secuencia está unida al extremo carboxi de un péptido de glucagón de la presente descripción.

[0088] En una realización, un procedimiento para reducir el aumento de peso o inducir la pérdida de peso en un individuo comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende un agonista de glucagón que comprende un péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido 29 del péptido de glucagón está unido a un segundo péptido a través de un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 23. En una realización, el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 en el que el aminoácido 29 del péptido de glucagón se une a un segundo péptido a través de un enlace peptídico, y dicho segundo péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 23. En una realización, el péptido de glucagón del agonista de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13. En una realización, el segmento del péptido de glucagón del péptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17, en el que la peso molecular de la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. Más particularmente, en una realización, el péptido de glucagón del péptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 17 en el que el peso molecular de la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 1.000 a 5.000.

[0089] En otra realización, se administra una composición a un paciente para suprimir el apetito, prevenir el aumento de peso y/o inducir la pérdida de peso mediante la administración de una composición farmacéutica que comprende un primer péptido de glucagón pegilado y un segundo péptido de glucagón pegilado, en el que el primero y segundo péptido son péptidos de fusión que comprenden una extensión de péptido C-terminal que comprende la SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 23. El primer péptido de glucagón pegilado comprende un PEG unido covalentemente de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Daltons y el segundo péptido de glucagón pegilado comprende una cadena de PEG unida covalentemente de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0090] 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 estar unidos entre sí usando agentes enlazadores y procedimientos conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, los dímeros se pueden formar entre dos péptidos de glucagón modificados mediante el uso de agentes de reticulación bifuncionales tiol y agentes de reticulación de amina bifuncionales, en particular para los péptidos de glucagón que se han sustituido con residuos de cisteína, ornitina lisina, homocisteína o acetil fenilalanina (por ejemplo, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5). El dímero puede ser un homodímero o, alternativamente, puede ser un heterodímero. En una realización, el dímero comprende un homodímero de un péptido de fusión de glucagón en el que la parte de péptido de glucagón comprende un análogo agonista de la SEQ ID NO: 11 y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. En otra realización, el dímero comprende un homodímero de un análogo agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 11, en el que el péptido de glucagón comprende además una cadena de polietilenglicol unida covalentemente a la posición 21 o 24 del péptido de glucagón.

[0091] Según una realización, se proporciona un dímero que comprende un primer péptido de glucagón unido a un segundo péptido de glucagón a través de un enlazador, en el que el primer péptido de glucagón comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11 y el segundo péptido de glucagón comprende la SEQ ID NO: 33. Además, con respecto al segundo péptido de glucagón, cuando el aminoácido en la posición 28 es asparagina y el aminoácido en la posición 29 es treonina, el segundo péptido de glucagón comprende además uno o dos aminoácidos (seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu) añadidos al extremo carboxi del segundo péptido de glucagón, y sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos de glucagón.

[0092] Según otra realización, se proporciona un dímero que comprende un primer péptido de glucagón unido a un segundo péptido de glucagón mediante un enlazador, en el que el primero péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13 y el segundo péptido de glucagón se selecciona independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos de glucagón. En una realización el primer péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7 y el segundo péptido de glucagón se selecciona independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13. En una realización se forma el dímero entre dos péptidos en el que cada péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

[0093] Según una realización se proporciona una composición farmacéutica en la que la composición comprende un análogo agonista de glucagón de la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende una concentración de 1 mg/ml del análogo agonista de glucagón y 10-50 mM de Trietanolamina a pH 7,0-8,5. En una realización, la composición farmacéutica comprende una concentración de 1 mg/ml del análogo agonista de glucagón y 20 mM de trietanolamina a pH 8,5.

[0094] Los péptidos de glucagón modificados de la presente invención pueden proporcionarse según una realización como parte de un kit. En una realización, se proporciona un kit para la administración de un agonista de glucagón a un paciente en necesidad del mismo en el que el kit comprende cualquiera de los péptidos de glucagón de la invención en solución acuosa. Los péptidos de glucagón de ejemplo para la inclusión en tales kits incluyen un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en 1) un péptido de glucagón que comprende la secuencia SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 33; 2) un péptido de fusión de glucagón que comprende un análogo agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 33, y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNNTIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón; y 3) un péptido de glucagón pegilado de la SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 33, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 21 (KRNRNNTIA) o SEQ ID NO: 22 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón, en el que la cadena de PEG unida covalentemente a la posición 16, 17, 21 o 24 tiene un peso molecular de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En una realización, el kit se proporciona con un dispositivo para la administración de 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 alternativamente o además incluir una o más de una variedad de recipientes, por ejemplo, viales, tubos, botellas, jeringas precargadas de cámaras individuales o múltiples, cartuchos, bombas de infusión (externas o implantables), inyectores de chorro, dispositivos en lápiz precargados, que contienen opcionalmente el péptido de glucagón. Preferiblemente, los kits también incluirán instrucciones de uso. Según una realización, el dispositivo del 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 viene preenvasada dentro de la jeringa.

[0095] Los compuestos de esta invención se pueden preparar por procedimientos estándar de síntesis, las técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro procedimiento de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no se pueden expresar mediante técnicas de ADN recombinante estándar, las técnicas para su preparación son conocidos en la técnica. Los compuestos de esta invención que abarcan porciones no peptídicas pueden sintetizarse mediante reacciones de química orgánica convencionales, además de las reacciones de química de péptidos convencionales cuando sea aplicable.

EJEMPLOS

Protocolo de Síntesis general:

[0096] 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 fue Boc.

[0097] Cada resina de peptidilo completada 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].

[0098] La purificación se realizó en una FPLC sobre una columna C18 2,2 x 25 cm Kromasil mientras se monitorizaba la luz UV a 214 nm y se recogían fracciones de 5 minutos. Las fracciones homogéneas se combinaron y se liofilizaron para producir un producto de pureza > 95%. La masa molecular correcta y la pureza se confirmaron mediante análisis espectral de masas con MALDI.

Protocolo general de pegilación: (Cys-maleimido)

[0099] 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 1

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

[0100] Se introdujeron 0,2 mmol de resina Boc Thr(OBzl) Pam (SynChem Inc) en un recipiente de reacción de 60 ml y se desarrolló la siguiente secuencia en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430 A modificado usando acoplamientos individuales de Fast Boc activado por HBTU

HSQGTFTSDYSKYLDSCRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 27)

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

[0101] Las fracciones que contenían el producto más puro (48-52) se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para producir 30,1 mg. Un análisis de HPLC del producto mostró una pureza de > 90% y el análisis espectral de masas MALDI mostró la masa deseada de 3429,7. El Glucagón Cys²¹, Glucagón Cys²⁴, y Glucagón Cys²⁹ se prepararon de manera similar.

EJEMPLO 2

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

[0102] Se colocaron 285 mg (0,2 mmol) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) en un recipiente de reacción de 60 ml y se introdujo la siguiente secuencia y se desarrolló en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando acoplamientos individuales de Fast Boc activado por HBTU.

HSQGTFTSD YSKYLDSTRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 28)

Se utilizaron los siguientes grupos protectores de cadena lateral: Arg(Tos), Asp(OcHex), Asn(Xan), Cys(pMeBzl), Glu(OcHex), His(Boc), Lys(2Cl-Z), Ser(Bzl), Thr(Bzl), Trp(CHO) y Tyr(Br-Z). Se trató la resina de peptidilo completada con piperidina al 20%/dimetilformamida para eliminar la protección de Trp formilo, a continuación se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó a vacío. Se añadieron 1,0 ml de p-cresol y 0,5 ml de sulfuro de dimetilo junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato de HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó, y se condensaron aproximadamente 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora, a continuación se extrajo el HF al vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se desarrolló una HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm, tampón A de TFA al 0,1%, tampón B de TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] sobre una alícuota del extracto de separación. El extracto se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18

Kromasil 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo para la elución utilizando un sistema FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%. Gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min. Las fracciones 58-65 se combinaron, se congelaron y se liofilizaron para producir 198,1 mg.

[0103] El análisis por HPLC del producto mostró una pureza superior al 95%. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de la masa teórica deseada de 4316,7 con el producto como una amida C-terminal. La oxintomodulina y oxintomodulina-KRNR se prepararon de manera similar como los ácidos carboxílicos C-terminales empezando con la resina de PAM cargada apropiadamente.

EJEMPLO 3

Glucagón Cys¹⁷ Mal-PEG-5K

[0104] Se disolvieron 15,1 mg de Glucagón Cys¹⁷ (1-29) y 27,3 mg de metoxi poli(etilenglicol)maleimida de peso molecular promedio de 5.000 (mPEG-MAL-5000, Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se monitorizó mediante análisis por HPLC [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min]. Después de 5 horas, la mezcla de reacción se cargó sobre una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm. Se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en un FPLC de Pharmacia mientras se monitorizaba la UV a 214 nm y se recogían fracciones de 5 min. A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%, gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 25,9 mg.

[0105] Este producto se analizó por HPLC [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] y mostró una pureza de aproximadamente el 90%. El análisis espectral de masas MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) mostró un amplio rango de masas (típico de derivados de PEG) de 8.700 a 9.500. Esto demuestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3429) de aproximadamente 5,000 u.m.a.

EJEMPLO 4

Glucagón Cys²¹ Mal-PEG-5K

[0106] Se disolvieron 21,6 mg de Glucagón Cys²¹ (1-29) y 24 mg de mPEG-MAL-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS) y se añadieron 0,5 ml de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,01 M. La reacción se agitó a la temperatura ambiente. Después de 2 horas, se añadieron otros 12,7 mg de mPEG-MAL-5000. Después de 8 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en una FPLC de Pharmacia a 4 ml/min, mientras se recogían fracciones de 5 min. A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Gradiente = 20% a 80% de B durante 450 min.

[0107] Las fracciones correspondientes a la aparición de producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 34 mg. El análisis del producto por HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% de B a 80% de B durante 10 min] mostró un producto homogéneo que era diferente del péptido de glucagón de partida. El análisis espectral de masas MALDI (desorción/ionización mediante láser asistida por matriz) mostró un amplio rango de masas (típico de derivados de PEG) de 8.700 a 9.700. Esto demuestra una adición a la masa del péptido de glucagón de partida (3470) de aproximadamente 5,000 u.m.a.

EJEMPLO 5

Glucagón Cys²⁴ Mal-PEG-5K

[0108] Se disolvieron 20,1mg de Glucagón C²⁴ (1-29) y 39,5 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. La reacción se agitó a temperatura ambiente durante 7 horas, a continuación se añadieron otros 40 mg de mPEG-Mal-5000. Después de aproximadamente 15 h, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo usando una FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%, gradiente = 30% de B a 100% de B durante 450 min. Las fracciones correspondientes al producto se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 45,8 mg. El análisis espectral de masas MALDI mostró una típica señal amplia de PEG con un máximo a 9175,2 que es de aproximadamente 5.000 u.m.a. más que el glucagón C²⁴ (3.457,8).

EJEMPLO 6

Glucagón Cys²⁴ Mal-PEG-20K

[0109] Se disolvieron 25,7 mg de Glucagón Cys²⁴ (1-29) y 40,7 mg de mPEG-Mal-20K (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. Después de 6 horas, la relación de material de partida con respecto a producto era de aproximadamente 60:40, según se determinó por HPLC. Se añadieron otros 25,1mg de mPEG-Mal-20K y la reacción se dejó agitar otras 16 horas. La relación de producto no había mejorado de manera significativa, por lo que la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa Kromasil C18 2,2 x 25 cm y se purificó en una FPLC de Pharmacia usando un gradiente de 30% de B a 100% de B durante 450 min. Tampón A = TFA al 0,1%, tampón B = TFA al 0,1%/ACN al 50%, flujo = 4 ml/min, y se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitoriza la UV a 214 nm (2,0 A). Las fracciones que contenían producto homogéneo se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 25,7 mg. La pureza determinada por HPLC analítica fue ~90%. Un análisis espectral de masas MALDI mostró un pico amplio de 23.000 a 27.000 que es aproximadamente 20.000 u.m.a. más que el glucagón C²⁴ de partida (3.457,8).

EJEMPLO 7

Glucagón Cys²⁹ Mal-PEG-5K

[0110] Se disolvieron 20,0 mg de Glucagón Cys²⁹ (1-29) y 24,7 mg de mPEG-Mal-5000 (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de PBS con agitación a temperatura ambiente y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M. Después de 4 h, se añadieron otros 15,6 mg de mPEG-MAL-5000 para completar la reacción. Después de 8 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Vydac 2,2 x 25 cm y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en un sistema de FPLC de Pharmacia. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 75-97 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir 40,0 mg de producto que es diferente que el material de partida recuperado en HPLC (fracciones 58-63). El análisis del producto por HPLC analítica [C8 Zorbax 0,46 x 5 cm, 1 ml/min, 45C, 214 nm (0,5 A), A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 0% de B a 80 % de B durante 10 min] mostró una pureza superior al 95%. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de un componente de PEG con un rango de masas de 8.000 a 10.000 (máximo a 9025,3) que es 5.540 u.m.a. superior al material de partida (3484,8).

EJEMPLO 8

Glucagón Cys²⁴ (2-butirolactona)

[0111] A 24,7 mg de glucagón Cys²⁴ (1-29) se añadieron 4 ml de bicarbonato de amonio 0,05 M/acetónitrilo al 50% y 5,5 µl de una solución de γ -lactona del ácido 2-bromo-4-hidroxi-butírico (100 µl en 900 ul de acetónitrilo). 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 acetónitrilo (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.



SEQ ID NO: 29

Peso molecular = 3541,91

Masa exacta = 3538

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

EJEMPLO 9

Glucagón Cys²⁴ (S-carboximetilo)

5 [0112] Se disolvieron 18,1 mg de Glucagón Cys²⁴ (1-29) en 9,4 ml de tampón de fosfato de sodio 0,1 M (pH = 9,2) y se añadieron 0,6 ml de una solución de ácido bromoacético (1,3 mg/ml en acetonitrilo). La reacción se agitó a temperatura ambiente y el progreso de la reacción se siguió mediante HPLC analítica. Después 1 h se añadieron otros 0,1 ml de una solución de ácido bromoacético. La reacción se agitó otros 60 min, a continuación se acidificó con ácido acético acuoso y se cargó en una columna de fase inversa preparativa C18 Kromasil 2,2 x 25 cm para la purificación. Se desarrolló un gradiente de acetonitrilo FPLC de Pharmacia (flujo = 4 ml/min), mientras se recogían fracciones de 5 min y se monitorizaba la UV a 214 nm (2,0 A). A = TFA al 0,1%, B = TFA al 0,1%/ACN al 50%. Las fracciones 26-29 se combinaron, congelaron y liofilizaron para producir varios mg de producto. La HPLC analítica mostró una pureza del 90% y el análisis espectral de masas MALDI confirmó una masa de 3515 para el producto deseado.

15

20



25

Peso molecular = 3515.87
 Masa exacta = 3512
 Fórmula molecular = C153H224N42O50S2

SEQ ID NO: 30

EJEMPLO 10

30

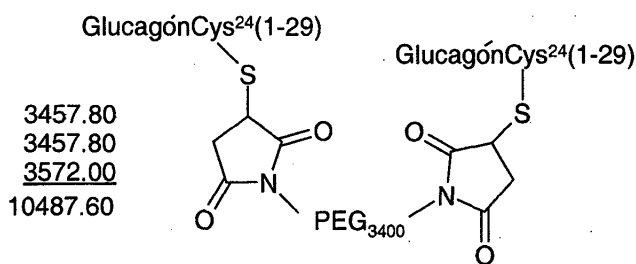
Dímero de Glucagón Cys²⁴ maleimido, PEG-3,4K

35 [0113] Se disolvieron 16 mg de glucagón Cys²⁴ y 1,02 mg de Mal-PEG-Mal-3400, poli(etilenglicol)bismaleimida de peso molecular promedio 3.400, (Nektar Therapeutics) en 3,5 ml de solución salina tamponada de fosfato y se añadieron 0,5 ml de EDTA 0,01 M y la reacción se agitó a temperatura ambiente. Después de 16 h, se añadieron otros 16 mg de glucagón Cys²⁴ y continuó la agitación. Después de aproximadamente 40 horas, la mezcla de reacción se cargó en una columna PepRPC 16/10 de Pharmacia y se desarrolló un gradiente de acetonitrilo en FPLC de Pharmacia, mientras se recogían fracciones de 2 min 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.

40

45

50



EJEMPLO 11

Ensayos de solubilidad del glucagón:

60 [0114] Se prepara una solución (1 mg/ml o 3 mg/ml) de glucagón (o un análogo) en HCl 0,01 N. Se diluyen 100 µl de solución madre a 1 ml con HCl 0,01 N y se determina la absorbancia UV (276 nm). El pH de la solución madre restante se ajusta a pH 7 usando 200-250 µl de Na₂HPO₄ 0,1 M (pH 9,2). La solución se deja reposar durante la noche a 4°C, a continuación se centrifuga. A continuación, se diluyen 100 µl de sobrenadante a 1 ml con HCl 0,01 N, y se determina la absorbancia UV (por duplicado).

65 [0115] La lectura de absorbancia inicial se compensa por el aumento de volumen y se utiliza el siguiente cálculo para establecer el porcentaje de solubilidad:

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

5 Los resultados se muestran en la tabla 1, en la que Glucagón-Cex representa el glucagón de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1) más la adición de un carboxi terminal de SEQ ID NO: 20 y Glucagón-Cex R¹² representa la SEQ ID NO: 1 en la que la Lys en posición 12 está sustituida por Arg y el péptido de SEQ ID NO: 20 se añade al extremo carboxilo.

10 Tabla 1: Datos de solubilidad para análogos de glucagón

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

15 **[0116]** La solubilidad de los análogos agonistas de glucagón, D28, E29, E30, E15D28, D28E30, D28E29, se investigó utilizando el mismo ensayo utilizado para los compuestos listados en la Tabla 1. Los datos (que se muestran en las figuras 3 y 4) muestran la superior solubilidad de los análogos D28, E29, E30, E15D28, D28E30, D28E29 con relación al glucagón natural a valores de pH de 5,5 y 7,0. Los datos presentados en la figura 3 representan la solubilidad medida después de 60 horas a 25°C, mientras que los datos presentados en la figura 4 representan la solubilidad medida después de 24 horas a 25°C y a continuación 24 horas a 4°C. La figura 5 representa los datos con respecto a la solubilidad máxima de los análogos de glucagón D28, D28E30 y E15D28.

20 EJEMPLO 12

Ensayo de unión al receptor de glucagón

25 **[0117]** La afinidad de los péptidos hacia el receptor de glucagón se midió en un ensayo de unión por competición utilizando la tecnología de ensayo de proximidad de centelleo. Se mezclaron diluciones en serie de 3 veces de los péptidos realizadas en tampón de ensayo de proximidad de centelleo (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, albúmina de suero bovino al 0,1% p/v) en placas de base blanca/clara de 96 pocillos (Corning Inc., Acton, MA) con (3 - [¹²⁵I]-yodotirosil) Tyr10 glucagón 0,05 nM (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6 microgramos por pocillo, fragmentos de membrana plasmática preparados a partir de células que sobreexpresan receptor de glucagón humano, y 1 mg/pocillo de partículas de ensayo de proximidad de centelleo con aglutinina tipo A de germen de trigo tratado con polietilenimina (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tras 5 min de agitación a 800 rpm en un agitador rotatorio, la placa se incubó 12 h a temperatura ambiente y a continuación se leyó en un contador de centelleo líquido MicroBeta1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Se midió la radioactividad no unida específicamente (NSB) en los pocillos con 4 veces mayor concentración de ligando nativo “frío” que la concentración más alta en muestras de ensayo y se detectó la radiactividad unida total en los pocillos con ningún competidor. Se calculó el porcentaje de unión específica de la siguiente manera: % unión específica = ((unida - NSB)/(unida total - NSB)) X 100. Los valores de IC₅₀ se determinaron mediante el uso de software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

40 EJEMPLO 13

Ensayo funcional - Síntesis de AMPc

45 **[0118]** La capacidad de los análogos de glucagón para inducir AMPc se midió en un ensayo indicador basado en luciferasa de luciérnaga. Se privaron de suero células HEK293 cotransfectadas con receptor de glucagón o de GLP-1 y gen de luciferasa unido a un elemento de respuesta de cAMP mediante el cultivo de 16h en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con suero de crecimiento bovino al 0,25% (HyClone, Logan, UT) y a continuación, se incubaron con diluciones en serie de glucagón, GLP-1 o nuevos análogos de glucagón durante 5 horas a 37°C, 5% de CO₂ en placas “Biocoat” de 96 pocillos recubiertos de poli-D-lisina (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación, se añadieron 100 microlitros de reactivo de sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin-Elmer, Wellesley, MA) a cada pocillo. La placa se agitó brevemente, se incubó 10 min en la oscuro y claro, y el resultado se midió en un contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones con 50% de eficacia se calcularon mediante el uso de software Origin (OriginLab, Northampton, MA). Los resultados se muestran en las Tablas 2 y 3.

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

Péptido	Inducción de AMPc			
	Receptor de glucagón		Receptor de GLP-1	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , nM	N*

Glucagón	0,22 ± 0,09	14	3,85 ± 1,64	10
GLP-1	2214,00 ± 182,43	2	0,04 ± 0,01	14
Glucagon Cex	0,25 ± 0,15	6	2,75 ± 2,03	7
Oxintomodulina	3,25 ± 1,65	5	2,53 ± 1,74	5
Oxintomodulina KRNR	2,77 ± 1,74	4	3,21 ± 0,49	2
Glucagón R12	0,41 ± 0,17	6	0,48 ± 0,11	5
Glucagón R12 Cex	0,35 ± 0,23	10	1,25 ± 0,63	10
Glucagón R12 K20	0,84 ± 0,40	5	0,82 ± 0,49	5
Glucagón R12 K24	1,00 ± 0,39	4	1,25 ± 0,97	5
Glucagón R12 K29	0,81 ± 0,49	5	0,41 ± 0,24	6
Glucagón Amida	0,26 ± 0,15	3	1,90 ± 0,35	2
Oxintomodulina C24	2,54 ± 0,63	2	5,27 ± 0,26	2
Oxintomodulina C24 PEG 20K	0,97 ± 0,04	1	1,29 ± 0,11	1

* - número de experimentos

Tabla 3 Inducción de AMPc mediante análogos de glucagón pegilado

Péptido	Inducción de AMPc			
	Receptor de glucagón		Receptor de GLP-1	
	EC ₅₀ , nM	N*	EC ₅₀ , nM	N*
Glucagón	0,33 ± 0,23	18	12,71 ± 3,74	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,82 ± 0,15	4	55,86 ± 1,13	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,37 ± 0,16	6	11,52 ± 3,68	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,22 ± 0,10	12	13,65 ± 2,95	4
Glucagón C17 PEG 5K	0,96 ± 0,07	2	12,71 ± 3,74	2
Glucagón C17 PEG 5K	0,08 ± 0,05	3	No determinada	
Glucagón C24 Dimero	0,10 ± 0,05	3	No determinada	
GLP-1	>1000		0,05 ± 0,02	4

* - número de experimentos

[0119] Los datos para análogos de glucagón adicionales se muestran en las figuras 6-9 y la tabla 4

5

Tabla 4

EC₅₀ observadas (nM) en células que sobreexpresan el receptor de glucagón

	Prueba 1	Prueba 2	Prueba 3	Prueba 4
Glucagón estándar	0,12	0,04	0,05	0,11
K29	0,35			0,22
K30	0,22	0,06		
K29, K30	0,89			
K30, K31		0,012		
D28		0,05		0,17
E28			0,14	
E29		0,05	0,04	
E30		0,04		
D28, D29			0,03	
D28, D30			0,05	
D28, E15			0,15	

10

EJEMPLO 14

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

15

[0120] Cada análogo de glucagón se disolvió en agua o PBS y se llevó a cabo un primer análisis HPLC. Después de ajustar el pH (4, 5, 6, 7), las muestras se incubaron durante un período de tiempo especificado a 37°C y se

reanalizaron por HPLC para determinar la integridad del péptido. Se determinó la concentración del péptido específico de interés y se calculó el porcentaje intacto restante en relación con el análisis inicial. Los resultados para glucagón Cys²¹-maleimidoPEG_{5K} se muestran en las figuras 1 y 2.

5 EJEMPLO 15

Cambios en la concentración de glucosa en suero en perros beagle después de la administración de análogos de glucagón

10 [0121] Se utilizaron perros Canino/Beagle de 8-12 kg, siendo de 8-16 meses de edad y con buena salud para determinar la farmacocinética y la farmacodinámica de la acción de glucagón. Cada animal ayunó durante la noche y sangró en los siguientes puntos de tiempo después de cada dosis: 0 h (pre-dosis), 5, 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240 minutos después de la dosis. Se usaron seis animales para cada grupo de dosis y se extrajeron aproximadamente 1-2 ml de sangre total en cada punto de tiempo. Se añadieron 1,0 ml de sangre entera a tubos de K2 EDTA que
15 contenían un volumen suficiente de Trasylol (aprotinina) para producir al menos 500 KUI/ml de sangre entera. Se recogieron aproximadamente 500 uL de plasma después de centrifugar las muestras en una centrífuga refrigerada a aproximadamente 1500 - 3000 xg durante 10-15 min. Las muestras se transfirieron a viales de plástico y se almacenaron congeladas a -70°C, o por debajo. Los 1,0 ml restantes de sangre entera se convirtieron en suero mediante la colocación de muestra de sangre en un tubo vacío, dejando reposar a temperatura ambiente durante 15-20 min, a continuación centrifugación a 1500 - 3000 xg durante 10-15 min. en una centrífuga refrigerada. Las
20 muestras se transfirieron a viales de plástico y se almacenaron congeladas a -70°C, o por debajo. El glucagón y los análogos se disolvieron en HCl 0,01 N a una concentración de 0,1667 mg/ml y los animales se dosificaron a 0,03 ml/kg.

25 [0122] A los animales se les administró una dosis de 0,005 mg/kg por vía intramuscular de glucagón, un análogo de glucagón que comprende glucagón con la secuencia de SEQ ID NO: 31 unida al extremo carboxi de glucagón (glucagon-CEX) o un análogo de glucagón que comprende una sustitución de ácido aspártico en el aminoácido 28 (glucagon-Asp28) de la SEQ ID NO: 11. Los datos resultantes se presentan en la Figura 10.

30 LISTA DE SECUENCIAS

<110> DiMarchi, Richard DiMarchi, Maria Chabenne, Joe

35 <120> Análogos de glucagón que muestran una mayor solubilidad en tampones de pH fisiológicos

<130> 29920-201206

40 <160> 38

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 29

45 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2

<211> 29

60 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Análogo de glucagón

65

<220>

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

5

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

10

<400> 2

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

15

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

20

<210> 3
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Análogo de glucagón

30

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa es Arg, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

35

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

40

<400> 3

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

45

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

50

<210> 4
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Análogo de glucagón

60

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es Asp, Cys, Orn, homocisteína o acetil fenilalanina

65

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

<400> 4

20

25

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

10 <220>
 <223> Análogo de glucagón

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

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico

25 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Thr, Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico

30 <400> 7
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

35 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20 25

40 <210> 8
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Análogo de glucagón

50 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

55 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Asp o Glu

60 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Thr, Asp o Glu

<400> 8

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

ES 2 628 063 T3

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

5 <210> 9
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Análogo de glucagón

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

20 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Asp o Glu

<400> 9
 25 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

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

35 <210> 10
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Análogo de glucagón

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

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

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

60 <210> 11
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65 <220>
 <223> Análogo de glucagón

<400> 11
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser

ES 2 628 063 T3

<400> 14
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Cys
 1 5 10 15
 5
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr
 20 25
 10
 <210> 15
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15
 <220>
 <223> Análogo de glucagón
 20
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> pegilación
 25
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 30
 <400> 15
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 35
 Cys Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr
 20 25
 40
 <210> 16
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45
 <220>
 <223> Análogo de glucagón
 50
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> pegilación
 55
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa en la posición 27 = Met, Leu o Nle
 60
 <400> 16
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 65
 Arg Arg Ala Gln Cys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr
 20 25

<210> 17
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Análogo de glucagón
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> pegilación
 15
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa en la posición 27 = Met, Leu o Nle
 20
 <400> 17
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 25
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Cys Trp Leu Xaa Asp Thr
 20 25
 30
 <210> 18
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35
 <220>
 <223> Análogo de glucagón
 40
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (21)..(21)
 <223> pegilación
 45
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 <400> 18
 50
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 55
 Arg Arg Ala Gln Lys Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr
 20 25
 60
 <210> 19
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65
 <220>
 <223> Análogo de glucagón
 <220>

<221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> pegilación

5 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle

10 <400> 19
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Arg Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

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

20 <210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> fragmento de péptido que representa los 10 aminoácidos carboxi
 terminal de Exendina-4

30 <400> 20
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 1 5 10

35 <210> 21
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> fragmento de péptido que representa los 8 aminoácidos carboxi terminal
 de oxintomodulina

45 <400> 21
 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
 1 5

50 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> fragmento de péptido que representa los 4 aminoácidos del extremo
 carboxi de oxintomodulina de SEQ ID NO: 21

60 <400> 22
 Lys Arg Asn Arg
 1

65 <210> 23
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> fragmento de péptido que representa los 10 aminoácidos carboxi
 terminal de Exendina-4
 5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> AMIDACIÓN
 10

<400> 23
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 15 1 5 10

<210> 24
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20

<220>
 <223> Análogo de glucagón
 25

<400> 24
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 30 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Gly Pro Ser
 35 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35 35

<210> 25
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40

<220>
 <223> Análogo de glucagón
 45

<400> 25
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 50 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn
 55 20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
 60 35

<210> 26
 <211> 33
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 65

<220>
 <223> Análogo de glucagón

ES 2 628 063 T3

<400> 26

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Lys Arg Asn
 10 20 25 30

Arg

15 <210> 27
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Análogo de glucagón

25 <400> 27

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

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

35 <210> 28
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Análogo de glucagón

45 <400> 28

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Gly Pro Ser
 50 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

55 <210> 29
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Análogo de glucagón

65 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 <223> 2-butirolactona unida a través de grupo tio1 de Cys

ES 2 628 063 T3

<400> 29

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 10 20 25

<210> 30
 <211> 29
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo de glucagón

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (24)..(24)
 25 <223> grupo carboximetilo unido a través de grupo tiol de Cys

<400> 30

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 30 1 5 10 15

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr
 35 20 25

<210> 31
 <211> 39
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo de glucagón

45 <400> 31

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 50 1 5 10 15

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 60 35

<210> 32
 <211> 30
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Análogo de glucagón

<220>
 <221> MISC_FEATURE

ES 2 628 063 T3

<222> (30)..(30)
 <223> Xaa es Asp, Glu, Lys, Arg o His

 <400> 32
 5 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15

 10 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr Xaa
 20 25 30

 <210> 33
 15 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Análogo de glucagón

 <220>
 25 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido
 homocisteico

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

 <220>
 35 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Asn, Lys, Arg, His, Asp o Glu

 <220>
 40 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Thr, Lys, Arg, His, Asp o Glu

 <400> 33
 45 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser
 1 5 10 15

 50 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Xaa Xaa
 20 25

 <210> 34
 55 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 60 <223> Análogo de glucagón

 <220>
 65 <221> MISC_FEATURE
 <222> (15)..(15)
 <223> Xaa es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o ácido
 homocisteico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Met, Leu o Nle
 5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Asn o un aminoácido ácido
 10

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa es Thr o un aminoácido ácido
 15

<400> 34
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Xaa Ser
 1 5 10 15
 20

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

<210> 35
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30

<220>
 <223> Análogo de glucagón
 <400> 35
 35

His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 40

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr Gly Pro Ser
 20 25 30
 45

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 36
 <211> 37
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50

<220>
 <223> Análogo de glucagón
 <400> 36
 55

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

Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr Lys Arg Asn
 20 25 30
 65

Arg Asn Asn Ile Ala
 35

ES 2 628 063 T3

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

 <220>
 <223> Análogo de glucagón
 10 <400> 37
 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 15 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr Lys Arg Asn
 20 20 25 30
 20 Arg

 <210> 38
 25 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 30 <223> Análogo de glucagón
 <400> 38
 35 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
 1 5 10 15
 40 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Glu Thr
 20 25
 45
 50

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido de glucagón con mayor solubilidad a pH 7 después de 24 horas a 25°C en relación con el glucagón natural, en el que el péptido de glucagón consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 modificada teniendo:
- 10 (a) un aminoácido cargado negativamente en la posición 28, y
 (b) un aminoácido cargado negativamente en la posición 29 o un aminoácido cargado negativamente añadido en la posición 30 del péptido de glucagón,
 en el que un "aminoácido cargado negativamente" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que está cargada negativamente en solución acuosa a pH 7,
 y en el que el péptido de glucagón está opcionalmente modificado para comprender hasta 7 modificaciones de aminoácidos adicionales en relación a la SEQ ID NO: 1, dicha modificación seleccionada del grupo que consiste en:
 (a) sustituciones conservativas en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 24;
 15 (b) el aminoácido en la posición 27 en la SEQ ID NO: 27 está sustituido por Leu o Nle;
 (c) el aminoácido en la posición 15 está sustituido por Glu, homo-Glu, ácido cisteico, ácido homocisteico;
 (d) un resto hidrófilo está unido covalentemente en la posición 16, 17, 20, 21, 24 o 29 de dicho péptido de glucagón;
 (e) una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22 está unida al extremo carboxilo de dicho péptido de glucagón;
 20 (f) un aminoácido en la posición 2 se selecciona del grupo que consiste en d-serina, alanina, glicina, n-metil serina y ácido amino isobutírico; o el aminoácido en la posición 1 se selecciona del grupo que consiste en d-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homohistidina; y
 (g) una combinación de los mismos.
- 25 2. Péptido de glucagón, según la reivindicación 1, en el que el aminoácido cargado negativamente es Glu o Asp.
- 30 3. Péptido de glucagón, según la reivindicación 2, en el que (i) el aminoácido cargado negativamente en la posición 28 es Asp, o (ii) el aminoácido cargado negativamente en la posición 29 es Glu, o ambos (i) y (ii).
- 35 4. Péptido de glucagón, según la reivindicación 1, que comprende la SEQ ID NO: 32 o SEQ ID NO: 34.
- 40 5. Péptido de glucagón, según la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos del péptido de glucagón es SEQ ID NO: 1 con Asp en la posición 28 y Glu en la posición 29 o Glu en la posición 30.
- 45 6. Péptido de glucagón, según la reivindicación 1, en el que el resto hidrófilo se selecciona entre polietilenglicol; cadena de polietilenglicol con un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons; y cadena de polietilenglicol con un peso molecular de al menos aproximadamente 20.000 Daltons.
- 50 7. Multímero, dímero, heterodímero u homodímero que comprende dos péptidos de glucagón, según la reivindicación 1, unidos entre sí a través de un enlazador.
- 55 8. Composición farmacéutica que comprende un péptido de glucagón, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o un multímero, dímero, heterodímero u homodímero, según la reivindicación 7, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 9. Kit para administrar un agonista de glucagón a un paciente en necesidad del mismo, comprendiendo dicho kit la composición farmacéutica, según la reivindicación 8, y un dispositivo para administrar dicha composición a un paciente.
10. Kit, según la reivindicación 9, en el que dicho dispositivo es un dispositivo de dispensación en aerosol, en el que la composición está preenvasada en el dispositivo de aerosol, o comprende una jeringa y una aguja, en el que la composición está preenvasada en la jeringa.
11. Péptido de glucagón, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para utilizar en el tratamiento de la hipoglucemia, o la inducción de la parálisis temporal del tracto gastrointestinal.

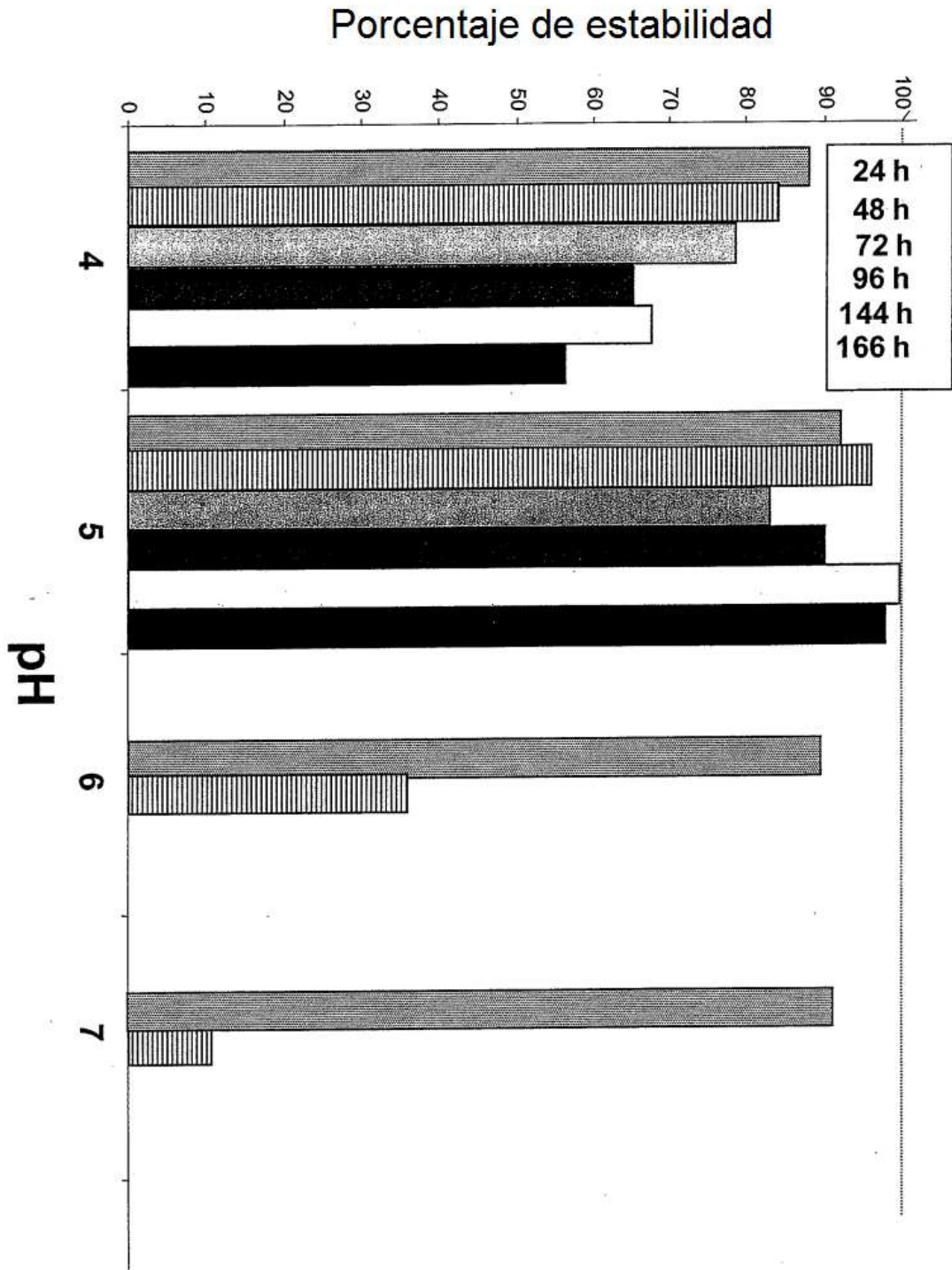


Figura 1. Estabilidad de glucagón Cys²¹-maleimidopEG_{5K} (37°C)

Figura 3. Solubilidad y estabilidad de análogos de glucagón después de 60 horas a 25°C a varios pH

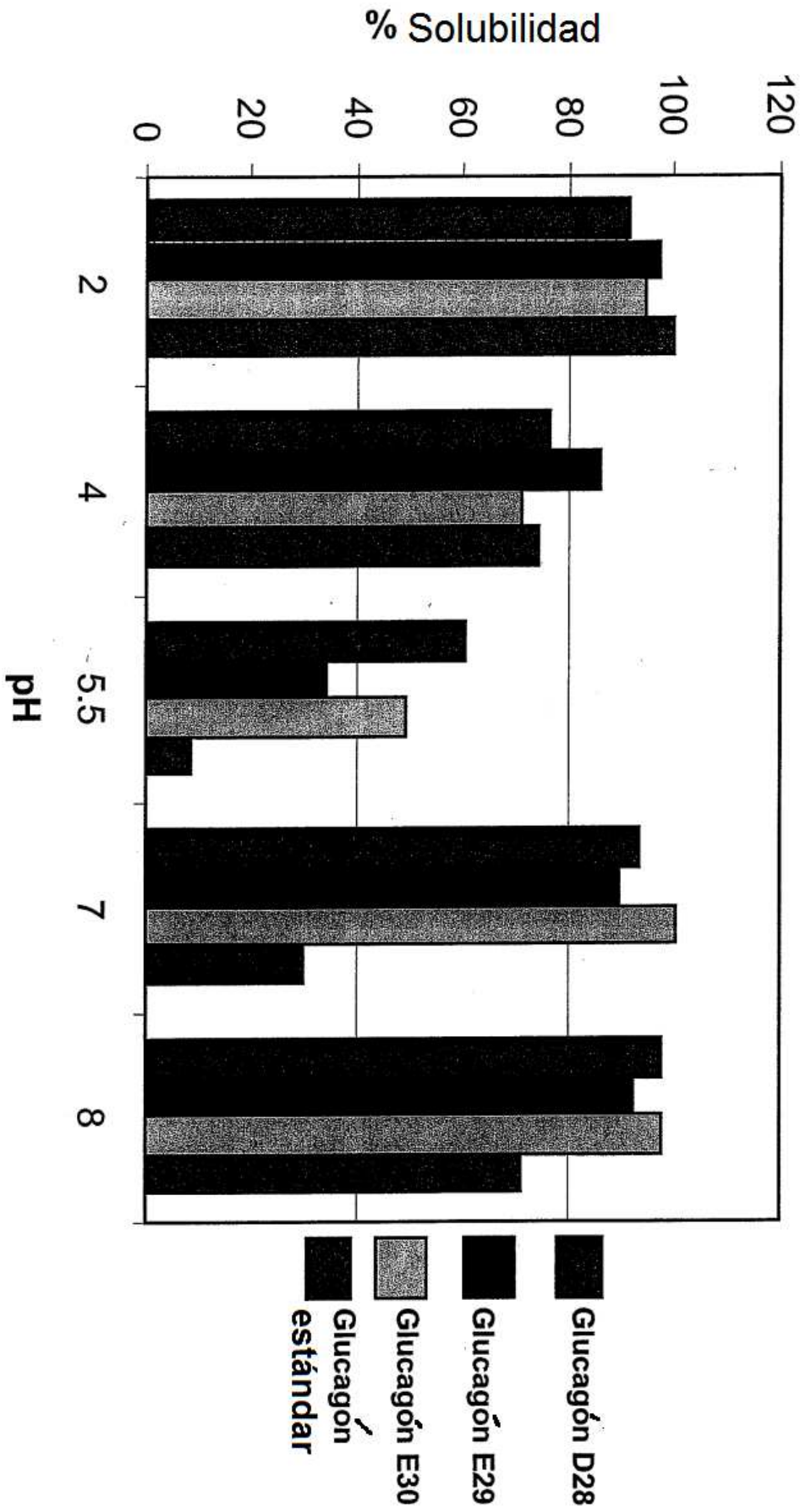


Figura 4. Solubilidad de análogos de glucagón aniónicos
(24h a 25C y 24h a 4C)

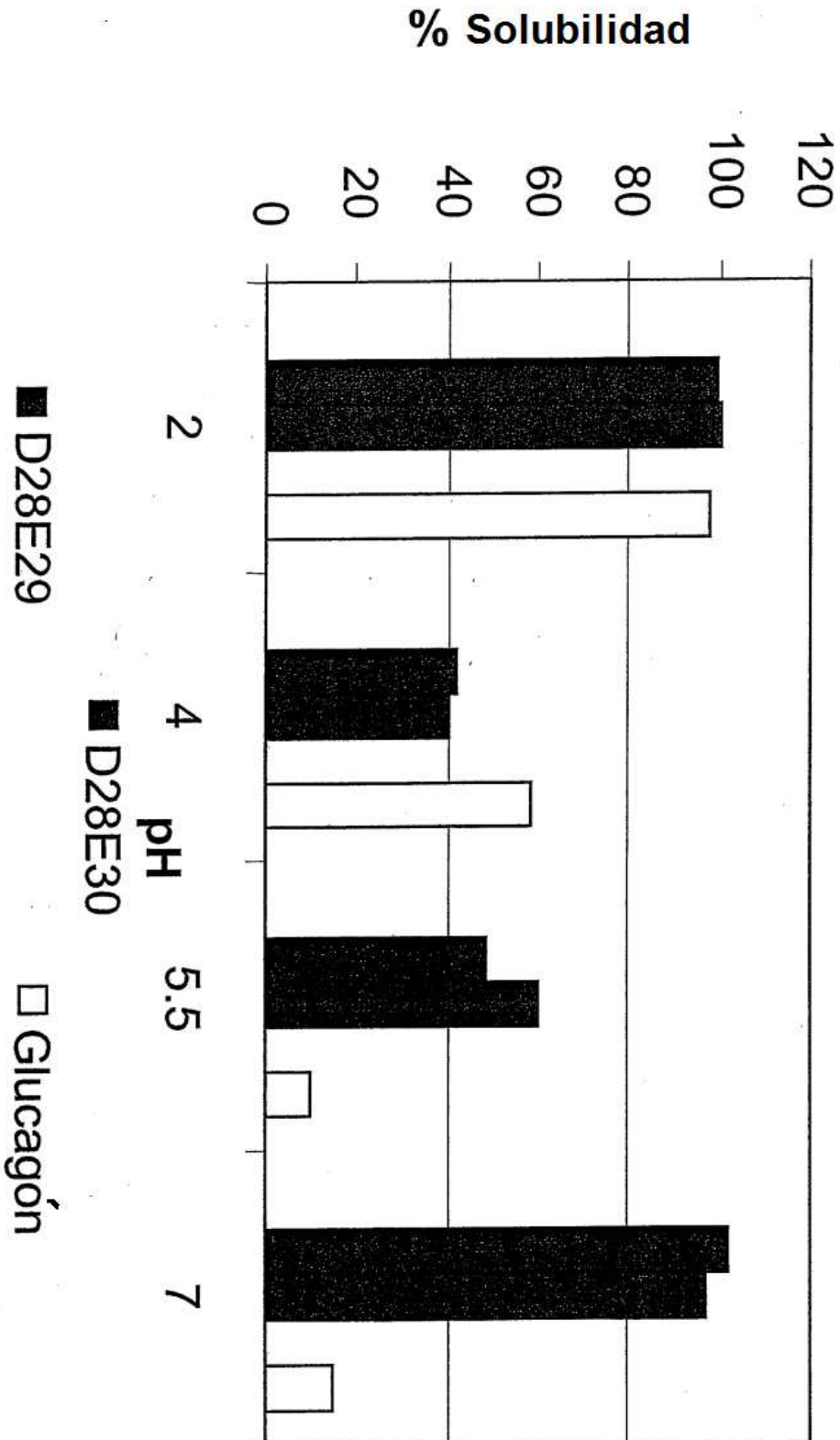


Figura 5. Estudio de solubilidad máxima de análogos de glucagón después de 24h , pH 7a 4C

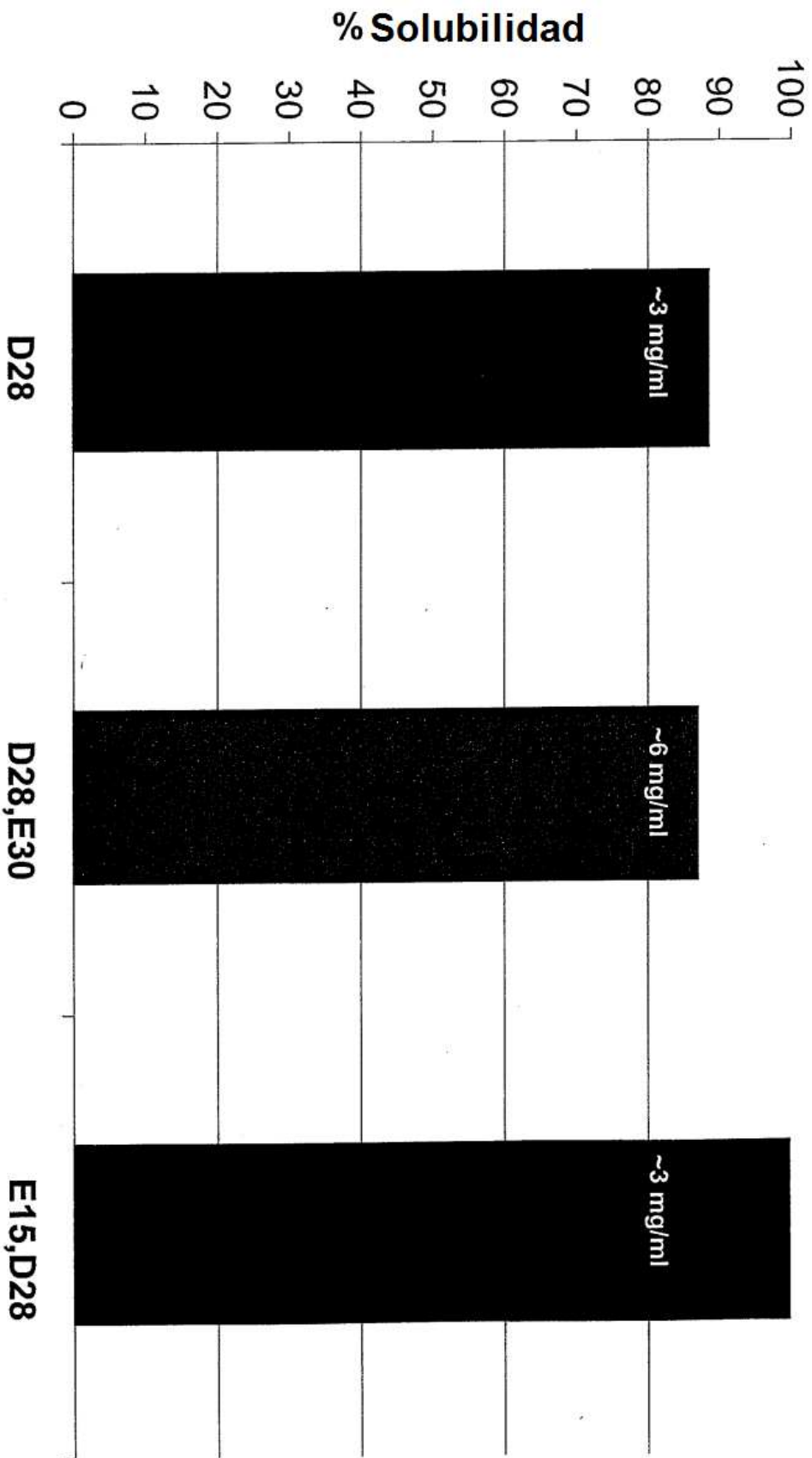


Figura 6. Inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón

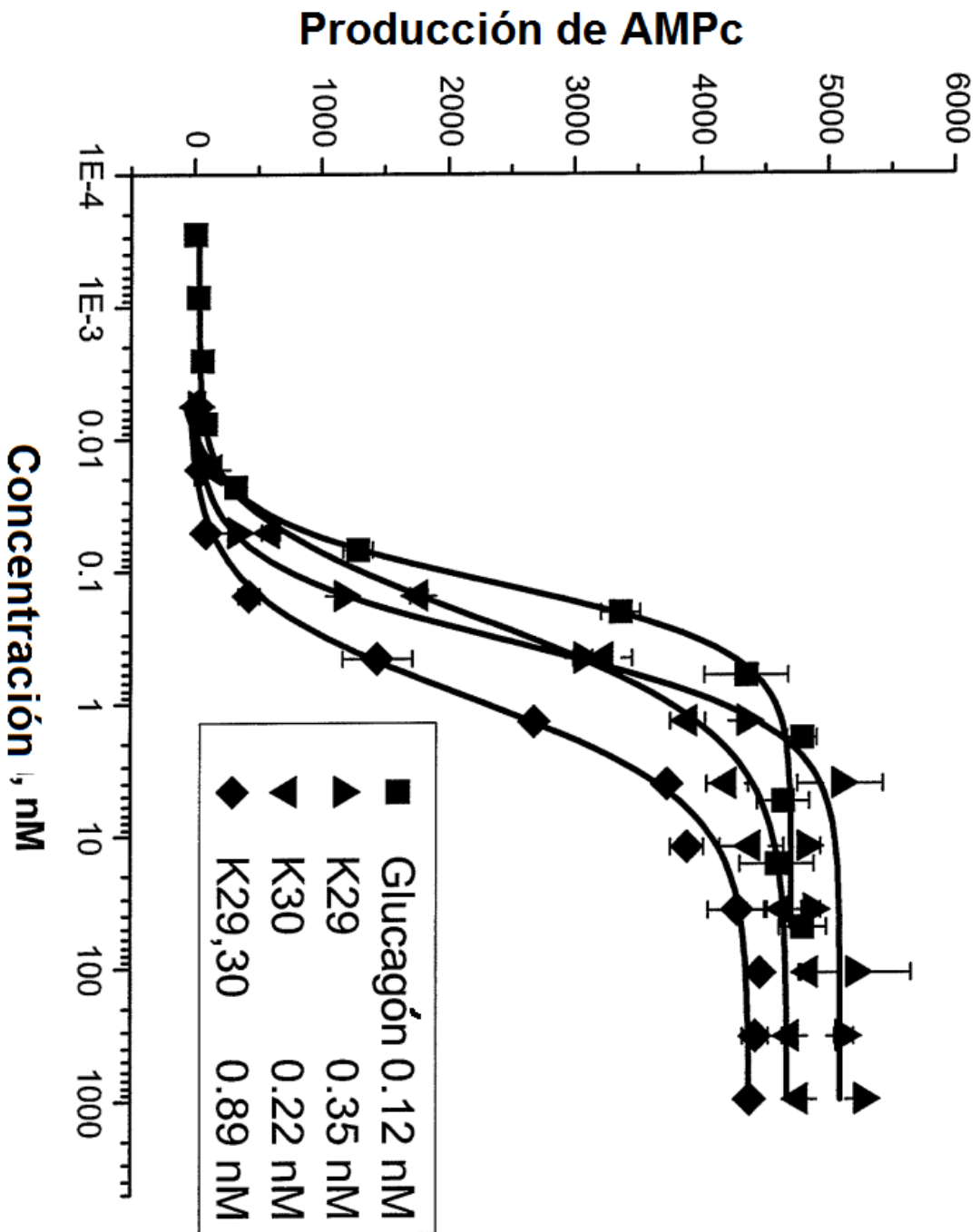


Figura 7. Inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón

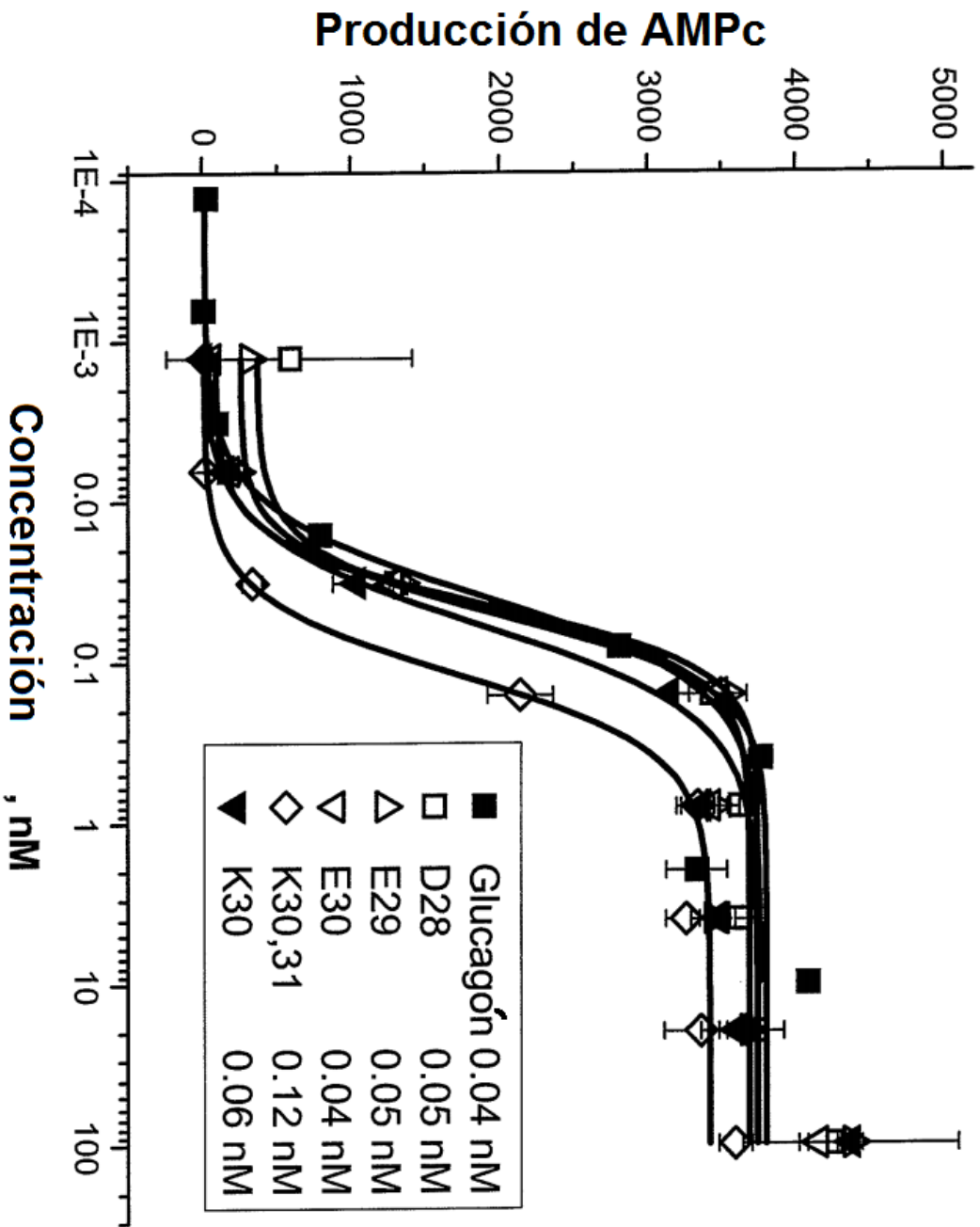


Figura 8. Inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón

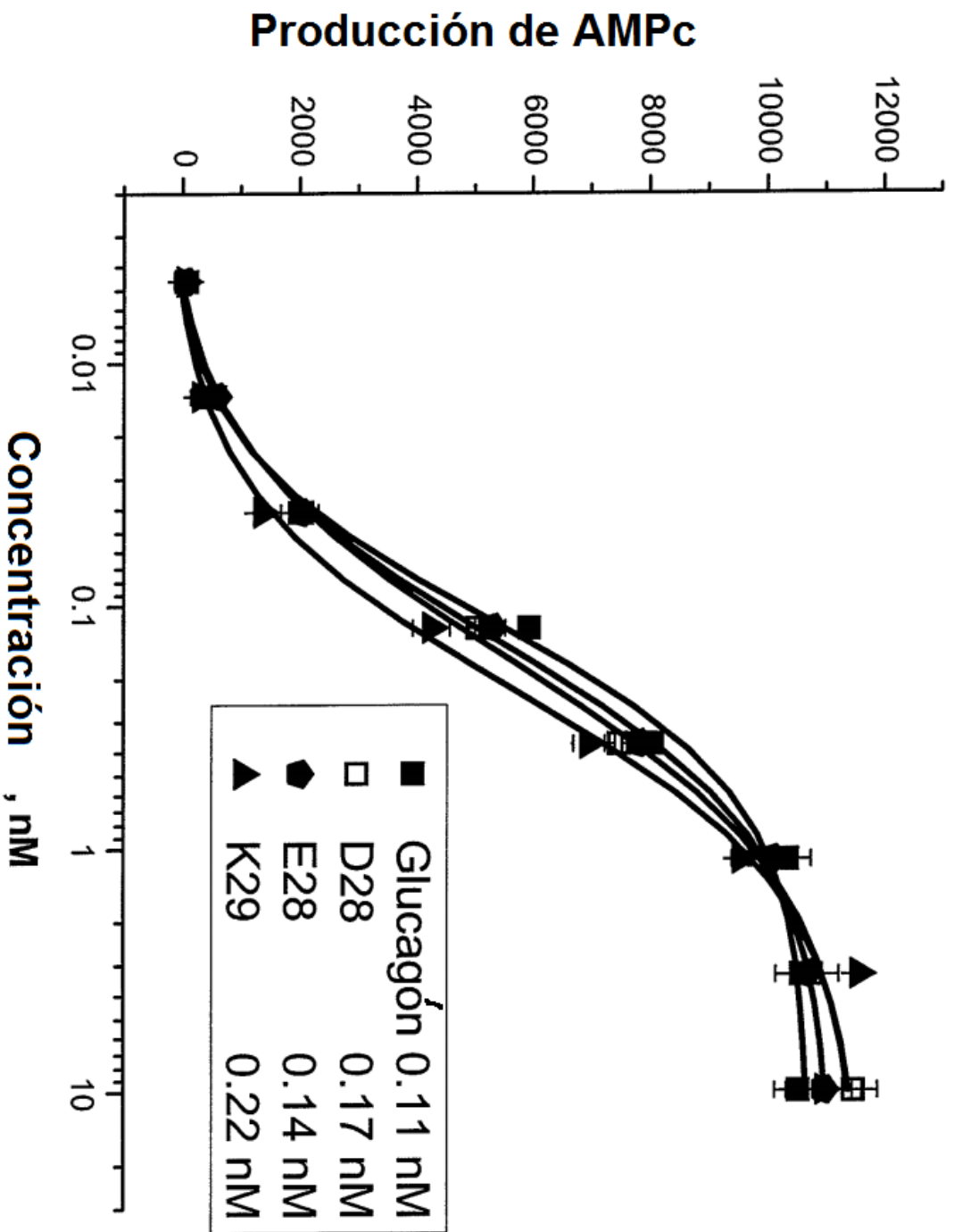
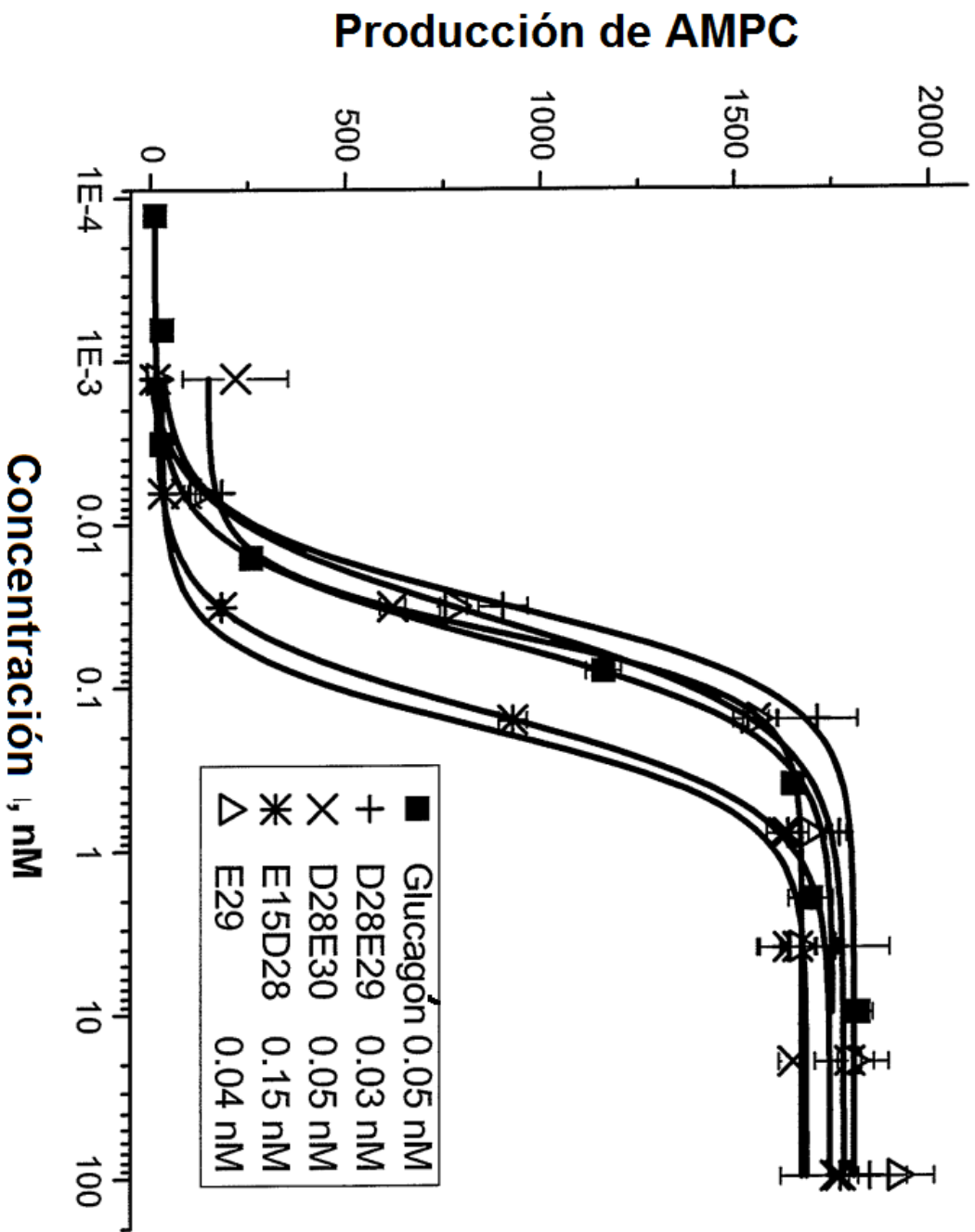


Figura 9. Inducción de AMPc mediada por receptor de glucagón



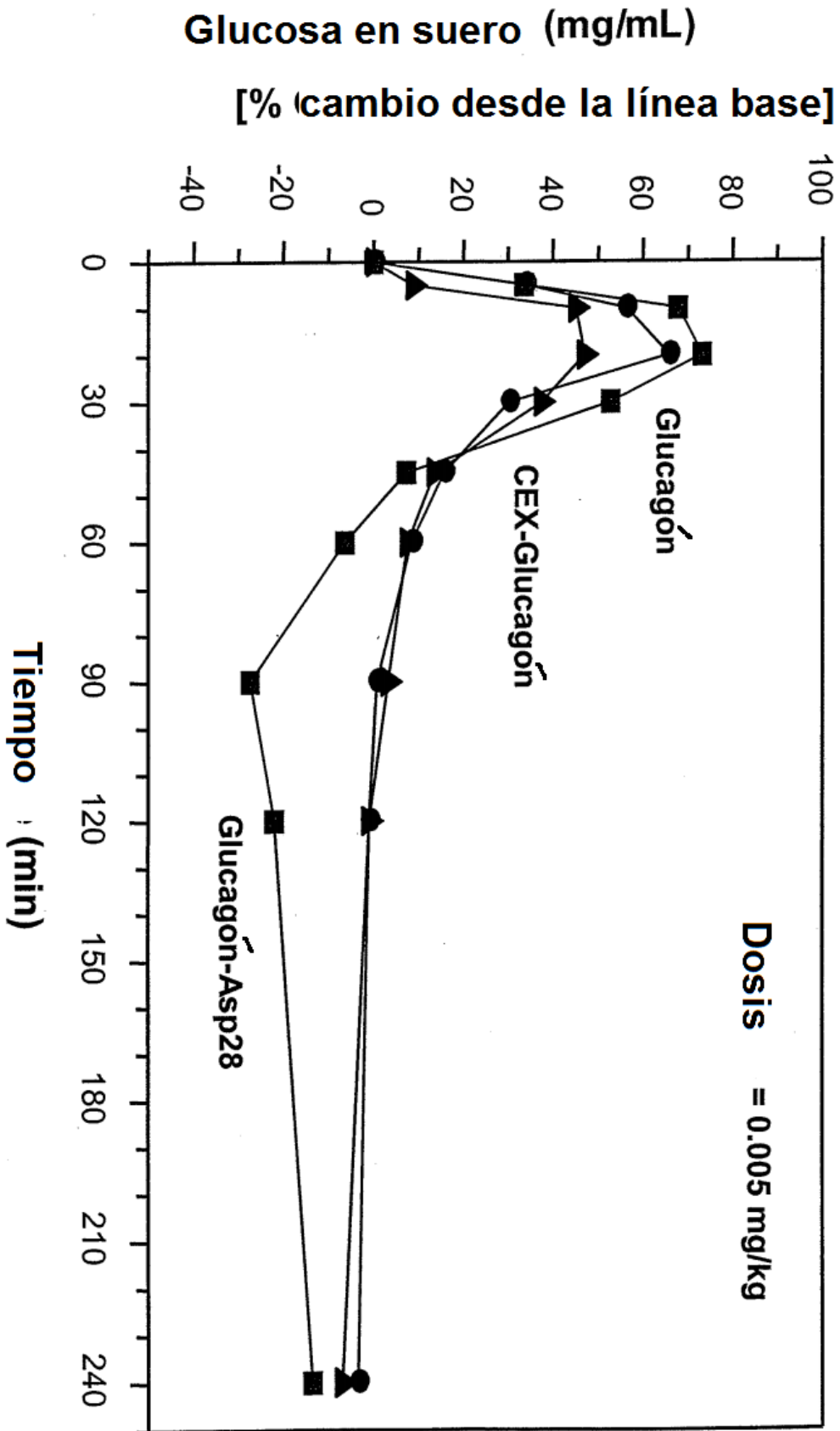


Figura 10. Cambio en las concentraciones de glucosa en suero en perros Beagle después de administración IM de glucagón y análogos de glucagón