

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 636 445**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/26</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/17</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/04</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.06.2012 PCT/US2012/042084**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2012 WO12177443**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2012 E 12802005 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017 EP 2723367**

54 Título: **Coagonistas de receptores de glucagón/GLP-1**

30 Prioridad:

**22.06.2011 US 201161500027 P**  
**14.10.2011 US 201161547360 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**05.10.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

**ES 2 636 445 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**

Coagonistas de receptores de glucagón/GLP-1

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

**[0001]** Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional US No. 61/500.027, presentada el 22 de junio de 2012 y la solicitud provisional US No. 61/547.360, presentada el 14 de octubre de 2012.

10 ANTECEDENTES

**[0002]** El pre-proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa en diferentes tejidos para formar un conjunto de diferentes péptidos derivados de proglucagón, incluyendo glucagón, péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), péptido similar al glucagón 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM), que están involucrados en una amplia variedad de funciones fisiológicas, incluyendo homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico, y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 33 a 61 de pre-proglucagón, mientras que el GLP-1 se produce como un péptido de 37 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 72 a 108 de pre-proglucagón. GLP-1 (7-36) amida o GLP-1 (7-37) ácido son formas biológicamente potentes de GLP-1, que demuestran actividad esencialmente equivalente en el receptor de GLP-1.

**[0003]** Durante la hipoglucemia, cuando los niveles de glucosa en sangre caen por debajo de lo normal, el glucagón señala el hígado para descomponer el glucógeno y liberar la glucosa, causando que los niveles de glucosa en la sangre aumenten hacia un nivel normal. La hipoglucemia es un efecto común secundario de la terapia con insulina en pacientes con hiperglucemia (niveles elevados de glucosa en sangre) debido a la diabetes. Por lo tanto, el papel más reconocido del glucagón en la regulación de la glucosa es contrarrestar la acción de la insulina y mantener los niveles de glucosa en sangre.

**[0004]** GLP-1 tiene diferentes actividades biológicas en comparación con el glucagón. Sus acciones incluyen la estimulación de la síntesis y secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón, y la inhibición de la ingesta de alimentos. Se ha demostrado que GLP-1 reduce la hiperglucemia en los diabéticos. La exendina-4, un péptido del veneno de lagarto que comparte una identidad de aminoácidos del 50% con GLP-1, activa el receptor de GLP-1 y del mismo modo se ha demostrado que reduce la hiperglucemia en los diabéticos.

**[0005]** También hay pruebas de que GLP-1 y exendina-4 pueden reducir la ingesta de alimentos y promover la pérdida de peso, un efecto que sería beneficioso no sólo para los diabéticos, sino también para los pacientes que sufren de obesidad. Los pacientes con obesidad tienen un mayor riesgo de diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular y enfermedades del aparato locomotor.

**[0006]** El documento WO 2009/155258 da a conocer análogos de glucagón natural en el que los análogos tienen una actividad mejorada en el receptor de GLP-1 con relación a la actividad del glucagón natural en el receptor de GLP-1. Más particularmente, la referencia describe que la formación de puentes intramoleculares, o la sustitución del ácido carboxílico terminal por un grupo amida, produce péptidos que muestran actividad coagonista de los receptores de glucagón/GLP-1. La solubilidad y la estabilidad de estos análogos de glucagón de alta potencia pueden mejorarse aún más mediante la modificación de los polipéptidos mediante pegilación, acilación, alquilación, sustitución de aminoácidos carboxi terminales, truncamiento C-terminal, o la adición de un péptido carboxi terminal seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) y SEQ ID NO: 28 (KRNR).

**[0007]** El documento WO/2010/071807 da a conocer análogos de profármaco de glucagón natural en el que el péptido de glucagón es modificado por la unión de un dipéptido a la superfamilia de glucagón través de un enlace amida. El enlace del profármaco inhibe que la actividad del péptido de glucagón, y su posterior eliminación restaura la actividad. Ventajosamente, la forma de profármaco se convierte en la forma activa en condiciones fisiológicas a través de una reacción no enzimática impulsada por la inestabilidad química.

55 DESCRIPCIÓN RESUMIDA

**[0008]** La presente invención se refiere a un péptido de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones. La presente invención también se refiere a un conjugado tal como se define en el conjunto de reivindicaciones. La presente invención además se refiere a un dímero o multímero tal como se define en el conjunto de reivindicaciones. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica y su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección médica seleccionada del grupo que consiste en: síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa tal como se define en el conjunto de reivindicaciones.

**[0009]** La presente descripción proporciona péptidos y péptidos variantes que muestran actividad en el receptor de glucagón, actividad en el receptor de GLP-1, o la actividad en cada uno del receptor de glucagón y el receptor de

GLP-1. En realizaciones de ejemplo, los péptidos descritos en el presente documento y péptidos variantes muestran mayor actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural. En aspectos de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran selectividad de por lo menos 100 veces para el receptor de GLP-1 humano frente al receptor de GIP.

[0010] La presente descripción proporciona conjugados que comprenden cualquiera de los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento conjugados con un grupo heterólogo. En aspectos de ejemplo, el grupo heterólogo es un péptido o proteína y el conjugado es un péptido de fusión o péptido quimérico. En aspectos de ejemplo, el grupo heterólogo es un polímero, por ejemplo, un polietilenglicol. La presente descripción además proporciona dímeros y multímeros que comprenden cualquiera de los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento.

[0011] La presente descripción proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable, así como un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección médica (por ejemplo, síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática, una enfermedad neurodegenerativa, hipoglucemia) en un paciente. El método comprende administrar al paciente un péptido o péptido variante descrito en el presente documento, opcionalmente formulada en una composición farmacéutica, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección médica.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

### [0012]

La Figura 1 representa un gráfico del cambio de peso corporal acumulativo (gramos) de los ratones DIO tratados con un control de vehículo o una dosis de un péptido de SEQ ID NO: 12, 17, 18, o 19, tal como se detalla en el Ejemplo 7.

La Figura 2 representa un gráfico de la glucosa basal (mg/dl) de ratones DIO tratados con un control de vehículo o una dosis de un péptido de SEQ ID NO: 12, 17, 18, o 19, tal como se detalla en el Ejemplo 7.

La Figura 3A representa un gráfico del cambio de peso corporal acumulativo (%) de monos rhesus obesos tratados con un control de vehículo, liraglutida (Lira), o una dosis de un péptido de SEQ ID NO: 17 o 20, tal como se detalla en el Ejemplo 8.

La Figura 3B representa un gráfico de la ingesta de alimentos acumulativa (expresado como el porcentaje de la ingesta de alimentos en el día 0) de monos rhesus obesos tratados con un control de vehículo, liraglutida, o una dosis de un péptido de SEQ ID NO: 17 o 20, tal como se detalla en el Ejemplo 8.

La Figura 4 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dl) de monos rhesus diabéticos tratados con un control de vehículo o una dosis de un péptido de SEQ ID NO: 17, tal como se detalla en el Ejemplo 9.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0013] La presente invención se refiere a un péptido de acuerdo con el conjunto de reivindicaciones. La presente invención también se refiere a un conjugado tal como se define en el conjunto de reivindicaciones. La presente invención además se refiere a un dímero o multímero tal como se define en el conjunto de reivindicaciones. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica y su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección médica seleccionada del grupo que consiste en: síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa tal como se define en el conjunto de reivindicaciones.

### DEFINICIONES

[0014] El término "aproximadamente" tal como se utiliza en este documento significa mayor o menor que el valor o intervalo de valores indicados en un 10 por ciento, pero no pretende designar cualquier valor o intervalo de valores sólo a esta definición más amplia. Cada valor o intervalo de valores precedidos por el término "aproximadamente" también pretende abarcar la realización del valor absoluto o intervalos de valores indicados.

[0015] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los portadores farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones, tales como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE.UU. o listados en la Farmacopea de los EE.UU. para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

[0016] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de compuestos que retienen la actividad biológica del compuesto parental, y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Muchos de los compuestos descritos en este documento son capaces de formar sales ácidas y/o básicas debido a la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

**[0017]** Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas, incluyen, a modo de ejemplo solamente, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero sin limitación, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

**[0018]** Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido plúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico, y similares.

**[0019]** 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 cambio en el nivel de glucosa en sangre más próximo al normal o la inducción de la pérdida de peso/prevención del aumento de peso, por ejemplo, tal como se mide, mediante la reducción del peso corporal, o la prevención o reducción de un aumento del peso corporal, o la normalización de la distribución de grasa corporal. La cantidad que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general de la persona, el modo de administración, y similares. De este modo, 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 en la técnica usando experimentación de rutina.

**[0020]** El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra ruta, tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

**[0021]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" comprende una cadena de 3 o más aminoácidos y normalmente menos de 100 aminoácidos, en la que los aminoácidos son aminoácidos naturales o codificados o no naturales o no codificados. Los aminoácidos no naturales se refieren a aminoácidos que se encuentran de forma natural in vivo, pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas en el presente documento. "No codificado" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un aminoácido que no es un L-isómero de cualquiera de los 20 aminoácidos siguientes: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. "Codificado", tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un aminoácido que es un L-isómero de cualquiera de los 20 aminoácidos siguientes: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento son de la misma longitud que la SEQ ID NO: 1 (que es de 29 aminoácidos de longitud), por ejemplo 25-35 aminoácidos de longitud. Las longitudes de ejemplo incluyen 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 aminoácidos de longitud.

**[0022]** Típicamente, los polipéptidos y las proteínas tienen una longitud de polímero que es mayor que la de "péptidos".

**[0023]** 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 cualquiera de sus análogos. Por ejemplo, una referencia en este documento a "posición 28" significaría la posición correspondiente 27 para un análogo de glucagón en la que el primer aminoácido de la SEQ ID NO: 1 ha sido eliminada. Del mismo modo, una referencia en este documento a "posición 28" significaría la posición correspondiente 29 para un análogo de glucagón en la que un aminoácido se ha añadido antes del extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1. Tal como se usa en el presente documento una "modificación de aminoácido" se refiere a (i) una sustitución o reemplazo de un aminoácido de la SEQ ID No: 1 por un aminoácido diferente (aminoácido de origen natural o codificado o no codificado o de origen no natural), (ii) una adición de un aminoácido (aminoácido de origen natural o codificado o no codificado o de origen no natural), a la SEQ ID No: 1 o (iii) una delección de uno o más aminoácidos de SEQ ID No: 1.

**[0024]** "Porcentaje de identidad" con respecto a dos secuencias de aminoácidos se refiere al número de aminoácidos de la primera secuencia que coinciden (son idénticos a) los aminoácidos en la segunda secuencia de referencia, dividido por la longitud de la secuencia de referencia, cuando las dos secuencias se alinean para conseguir una correspondencia máxima (por ejemplo, pueden introducirse huecos para el alineamiento óptimo).

**[0025]** "Modificación" de aminoácido se refiere a una inserción, delección o sustitución de un aminoácido por otro. En algunas realizaciones, la sustitución o reemplazo de aminoácido es una sustitución conservadora de aminoácidos, por ejemplo, una sustitución conservadora de aminoácido 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. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución conservadora de aminoácido" es la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, por ejemplo, tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o aromaticidad, e incluye los intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

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

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas:

Asp, Asn, Glu, Gln;

5 III. Residuos polares cargados positivamente:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Residuos alifáticos grandes, no polares:

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

V. Residuos aromáticos grandes:

10 Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

**[0026]** En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido no es una sustitución conservadora de aminoácidos, por ejemplo, es una sustitución de aminoácido no conservadora.

15 **[0027]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término " aminoácido cargado " o "residuo 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 los 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.  
20 Los aminoácidos cargados incluyen los aminoácidos cargados entre los 20 aminoácidos codificados, así como aminoácidos atípicos o de origen no natural o no codificados.

25 **[0028]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido que comprende un segundo resto ácido (distinto del ácido carboxílico del aminoácido), incluyendo por ejemplo, un grupo ácido carboxílico o ácido sulfónico.

30 **[0029]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido acilado" se refiere a un aminoácido que comprende un grupo acilo que es no natural a un aminoácido de origen natural, independientemente de los medios por los que se produce (por ejemplo, acilación antes de incorporar el aminoácido en un péptido, o acilación después de la incorporación en un péptido).

35 **[0030]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido alquilado" se refiere a un aminoácido que comprende un grupo alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural, independientemente de los medios por los que se produce. Por consiguiente, los aminoácidos acilados y los aminoácidos alquilados de la presente descripción son aminoácidos no codificados.

40 **[0031]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "selectividad" de una molécula para un primer receptor con relación a un segundo receptor se refiere a la siguiente relación: EC50 de la molécula en el segundo receptor dividida por la EC50 de la molécula en el primer receptor. Por ejemplo, una molécula que tiene una EC50 de 1 nM en un primer receptor y una EC50 de 100 nM en un segundo receptor tiene una selectividad de 100 veces para el primer receptor en relación con el segundo receptor.

45 **[0032]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucagón natural" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1 y el término "GLP-1 natural" es un término genérico que designa GLP-1 (7-36) amida, GLP-1(7-37) ácido o una mezcla de estos dos compuestos.

50 **[0033]** Tal como se usa en el presente documento, "potencia de glucagón" o "potencia comparada con el glucagón natural" de una molécula se refiere a la relación inversa de la EC50 de la molécula en el receptor de glucagón dividida por la EC50 del glucagón natural en el receptor de glucagón.

**[0034]** Tal como se usa en este documento, "potencia de GLP-1" o "potencia comparada con GLP-1 natural" de una molécula se refiere a la relación inversa de la EC50 de la molécula en el receptor de GLP-1 dividida por la EC50 de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

## 55 REALIZACIONES

**[0035]** La presente descripción proporcionan péptidos y péptidos variantes que muestran actividad en el receptor de GLP-1, en el receptor de glucagón, o tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucagón. En este sentido, la presente descripción proporciona péptidos agonistas del receptor de GLP-1, péptidos agonistas del receptor de glucagón y péptidos coagonistas de los receptores de GLP-1/glucagón. En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes descritos en el presente documento muestran una mayor actividad o una mayor potencia en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1). En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes de la presente descripción muestran mayor potencia en el receptor de GLP-1 en comparación con GLP-1 humano natural (SEQ ID NO: 2) o una de las formas activas del mismo (SEQ ID NOs: 5 y 6). En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran mayor potencia en el receptor de glucagón en comparación con GLP-1 humano natural. En realizaciones de ejemplo, los péptidos y

péptidos variantes muestran mayor potencia en el receptor de glucagón en comparación con el glucagón humano natural.

5 **[0036]** En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento muestran otras mejoras en las propiedades relativas a glucagón natural o GLP-1 natural, tales como una mayor estabilidad, mayor solubilidad, una vida media prolongada en la circulación, un retraso en la aparición de la acción, una duración prolongada de acción, un pico disminuido (por ejemplo, concentración plasmática máxima promedio relativamente disminuida), y una mejor resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV.

10 **[0037]** Los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento se basan en la secuencia de aminoácidos del glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1), y se describen en el presente documento como "péptidos", "péptidos variantes", "análogos de glucagón", "análogos" o "péptidos de glucagón". Se entiende que los términos, tales como "análogo" o "variante" o "modificaciones", abarcan péptidos o proteínas sintetizadas *de novo* y no requieren la realización de cualquier etapa de modificación particular. En algunos aspectos, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento comprenden una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 1, que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 modificaciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 1, y en algunos casos, 16 o más (por ejemplo, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26) modificaciones de aminoácidos, tal como se describe adicionalmente en este documento. La siguiente descripción de análogos de glucagón y/o péptidos de glucagón se aplica de este modo a cualquiera de los péptidos y péptidos variantes descritos en el presente documento, independientemente del grado de similitud entre el glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1) y el péptido o péptido variante de la presente descripción.

25 **[0038]** Se contempla que cualquiera de las secuencias peptídicas descritas en este documento puede estar variarse adicionalmente mediante la incorporación de modificaciones de aminoácidos adicionales; por ejemplo, mediante la inclusión de cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento, por ejemplo, en las posiciones descritas en este documento, o mediante la incorporación de sustituciones conservadoras, o volviendo al aminoácido del glucagón natural (ver SEQ ID NO: 1) en esa posición. En realizaciones de ejemplo, las modificaciones incluyen, por ejemplo, acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en C-terminal, la sustitución del aminoácido en una o más de las posiciones 1, 2, 3, 7, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, y 29. Por ejemplo, cuando cualquiera de las secuencias peptídicas descritas en este documento incluye una Cys para los propósitos de pegilación, un péptido variante puede utilizar un aminoácido diferente para la pegilación. Como otro ejemplo, un péptido variante puede ser pegilado en una posición diferente (por ejemplo, la sustitución de la Cys existente por un aminoácido diferente, la inserción de una nueva Cys en la posición de pegilación propuesta, y la pegilación de la nueva Cys). Como aún un ejemplo adicional, cuando cualquiera de las secuencias peptídicas descritas en este documento incluye una Lys a los efectos de acilación, la Lys puede ser trasladada a una posición diferente y la nueva posición se puede acilar. En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, los péptidos variantes pueden ser, por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95% idénticos a los péptidos parentales sobre la longitud de los péptidos parentales o sobre los aminoácidos 1-29 del péptido parental (por ejemplo, puede incorporar 1, 2, 3, 4, o 5 modificaciones adicionales en comparación con el péptido parental).

40 **[0039]** También se contemplan conjugados, proteínas de fusión y multímeros de cualquiera de las secuencias peptídicas descritas en este documento.

#### 45 ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS Y PÉPTIDOS VARIANTES

##### Actividad agonista en el receptor de glucagón

50 **[0040]** En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes de la presente descripción muestran una EC<sub>50</sub> en el receptor de glucagón de aproximadamente 1000  $\mu\text{M}$  o menos (por ejemplo, aproximadamente 750  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 500  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 250  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 100  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 75  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 50  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 25  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 10  $\mu\text{M}$  o menos, aproximadamente 5  $\mu\text{M}$  o menos, o aproximadamente 1  $\mu\text{M}$  o menos). En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC<sub>50</sub> para la activación del receptor de glucagón que está en el rango nanomolar. Por ejemplo, los péptidos y péptidos variantes descritos en el presente documento muestran una EC<sub>50</sub> en el receptor de glucagón que es aproximadamente 1000 nM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos). En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC<sub>50</sub> en el receptor de glucagón que está en el intervalo picomolar. En consecuencia, en aspectos a modo de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC<sub>50</sub> para la activación del receptor de glucagón de aproximadamente 1000 pM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 250 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 75 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, o aproximadamente 1 pM o menos). Se entiende que una EC<sub>50</sub> más baja indica una mayor actividad o potencia en el receptor.

**[0041]** En algunas realizaciones, los análogos de glucagón descritos en este documento muestran una EC50 en el receptor de glucagón que es de aproximadamente 0,001 pM o más, aproximadamente 0,01 o más, o aproximadamente 0,1 pM o más. La activación del receptor de glucagón (actividad del receptor de glucagón) se puede medir mediante ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor de glucagón, por ejemplo, el ensayo de células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor de glucagón y un gen luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc, tal como se describe en el Ejemplo 2.

**[0042]** En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes descritos en el presente documento muestran aproximadamente 0,001% o más, aproximadamente 0,01% o más, aproximadamente 0,1% o más, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 100% o más, aproximadamente 125% o más, aproximadamente 150% o más, aproximadamente 175% o más, aproximadamente 200% o más, aproximadamente 250% o más, aproximadamente 300% o más, aproximadamente 350% o más, aproximadamente 400% o más, aproximadamente 450% o más, o aproximadamente 500% o más actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural (potencia de glucagón). En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento presentan aproximadamente 5000% o menos o aproximadamente 10000% o menos actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural. La actividad de un análogo de glucagón en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de EC50 para el análogo de glucagón frente a el ligando natural.

**[0043]** En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes muestran actividad sustancial (potencia) en sólo el receptor de glucagón y poca o ninguna actividad en el receptor de GLP-1. Por consiguiente, en algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes se consideran como "agonistas puros de los receptores de glucagón" o no se consideran como un "coagonista de receptores de glucagón/GLP-1". En algunas realizaciones, estos péptidos y variantes de péptidos presentan cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de glucagón descrito en el presente documento, pero tienen sustancialmente menos actividad (potencia) en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón muestra una EC50 en el receptor de GLP-1 que es 100 veces o más que la EC50 en el receptor de glucagón.

#### Actividad agonista en el receptor de GLP-1

**[0044]** En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC50 para la activación del receptor de GLP-1 de aproximadamente 1000  $\mu$ M o menos (por ejemplo, aproximadamente 750  $\mu$ M o menos, aproximadamente 500  $\mu$ M o menos, aproximadamente 250  $\mu$ M o menos, aproximadamente 100  $\mu$ M o menos, aproximadamente 75  $\mu$ M o menos, aproximadamente 50  $\mu$ M o menos, aproximadamente 25  $\mu$ M o menos, aproximadamente 10  $\mu$ M o menos, aproximadamente 5  $\mu$ M o menos, o aproximadamente 1  $\mu$ M o menos). En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC50 en el receptor de GLP-1 de aproximadamente 1000 nM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos). En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes tienen una EC50 en el receptor de GLP-1 que está en el intervalo picomolar. En consecuencia, en aspectos a modo de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC50 para la activación del receptor de GLP-1 de aproximadamente 1000 pM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 250 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 75 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, o aproximadamente 1 pM o menos). Se entiende que una EC50 más baja indica una mayor actividad o potencia en el receptor.

**[0045]** En algunas realizaciones, los análogos de glucagón descritos en este documento muestran una EC50 en el receptor de GLP-1 que es de aproximadamente 0,001 pM o más, aproximadamente 0,01 o más, o aproximadamente 0,1 pM o más. La activación del receptor de GLP-1 (actividad del receptor de GLP-1) se puede medir mediante ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor de GLP-1, por ejemplo, el ensayo de células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor de GLP-1 y un gen luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc, tal como se describe en el Ejemplo 2.

**[0046]** En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos de la presente descripción muestran aproximadamente 0,001% o más, aproximadamente 0,01% o más, aproximadamente 0,1% o más, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 100% o más, aproximadamente 125% o más, aproximadamente 150% o más, aproximadamente 175% o más, aproximadamente 200% o más, aproximadamente 250% o más, aproximadamente 300% o más, aproximadamente 350% o más, aproximadamente 400% o más, aproximadamente 450% o más, o aproximadamente 500% o más

actividad en el receptor de GLP-1 en relación con el GLP-1 natural (potencia de GLP-1). En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento presentan aproximadamente 5000% o menos o aproximadamente 10000% o menos actividad en el receptor de GLP-1 en relación con el GLP-1 natural (potencia de GLP-1).

[0047] En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes muestran actividad sustancial (potencia) en sólo el receptor de GLP-1 y poca o ninguna actividad en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes se consideran como "agonistas puros de los receptores de GLP-1" o no se consideran como un "coagonista de receptores de glucagón/GLP-1". En algunas realizaciones, estos péptidos y variantes de péptidos presentan cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de GLP-1 descrito en el presente documento, pero tienen sustancialmente menos actividad (potencia) en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes muestran una EC50 en el receptor de glucagón que es 100 veces o más que la EC50 en el receptor de GLP-1.

#### Actividad agonista en el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón

[0048] En realizaciones de ejemplo, los péptidos y péptidos variantes muestran actividad tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucagón y se pueden considerar como "coagonistas de los receptores de glucagón/GLP-1". En realizaciones de ejemplo, la actividad (por ejemplo, la EC50 o la actividad relativa o potencia) de los péptidos y péptidos variantes en el receptor de glucagón está dentro de aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) que su actividad (por ejemplo, la EC50 o la actividad relativa o potencia) en el receptor de GLP-1. En aspectos de ejemplo, la potencia de glucagón del péptido o péptido variante está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) que su potencia de GLP-1. En aspectos de ejemplo, la potencia de glucagón del péptido o péptido variante está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10, o aproximadamente 5 veces menor de su potencia GLP-1.

[0049] En realizaciones de ejemplo, el coagonista es aproximadamente equipotente o relativamente más potente en el receptor de GLP-1 que el receptor de glucagón. Por ejemplo, la relación de la actividad relativa o la EC50 o la potencia del péptido o péptido variante en el receptor de glucagón dividida por la actividad relativa o la EC50 o la potencia del péptido o péptido variante en el receptor de GLP-1 es menor que, o es aproximadamente, X, donde X se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En realizaciones de ejemplo, la relación de la EC50 o potencia o actividad relativa del péptido o péptido variante en el receptor de glucagón dividida por la EC50 o potencia o actividad relativa del péptido o péptido variante en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 y menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En realizaciones de ejemplo, la relación de la EC50 o potencia o actividad relativa del péptido o péptido variante en el receptor de GLP-1 dividida por la EC50 o potencia o actividad relativa del péptido o péptido variante en el receptor de glucagón es inferior a 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En realizaciones de ejemplo, la relación de la potencia de glucagón del péptido o péptido variante en comparación con la potencia de GLP-1 del péptido o péptido variante es menor que, o es aproximadamente, Y, donde Y se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En realizaciones de ejemplo, la relación de la potencia de glucagón del péptido o péptido variante en comparación con la potencia de GLP-1 del péptido o péptido variante es inferior a 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, el análogo de glucagón tiene una EC50 en el receptor de glucagón, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC50 en el receptor de GLP-1.

[0050] En realizaciones de ejemplo, el péptido es principalmente un agonista de glucagón y es relativamente más potente en el receptor de glucagón que el receptor de GLP-1 (por ejemplo, el péptido es 5 veces o más potente en el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1). Por ejemplo, la relación de la actividad relativa o la potencia o la EC50 del péptido o péptido variante en el receptor de GLP-1 dividida por la actividad relativa o la potencia o la EC50 del péptido o péptido variante en el receptor de glucagón es menor que, o es aproximadamente, V, donde V se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 del péptido o péptido variante en comparación con la potencia de glucagón del péptido o péptido variante es menor que, o es aproximadamente, W, en donde W se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, el péptido o péptido variante muestra al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 (potencia de GLP-1) y muestra al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón (potencia de glucagón).

#### Actividad en el receptor de GIP

[0051] Además de ser activos en el receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento, en algunos aspectos, muestran baja actividad agonista en el receptor de GIP. En tales aspectos, preferiblemente dichos péptidos y péptidos variantes son al menos 100 veces más selectivos para el receptor de GLP-1 en relación con el receptor de GIP.

[0052] En otros aspectos, sin embargo, el péptido o péptido variante muestra actividad apreciable en el receptor de GIP, por ejemplo, la EC50 del análogo en el receptor de GIP es menor que aproximadamente 50 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, en el que la potencia de GIP del análogo está dentro de aproximadamente 50 veces de la potencia de GLP-1 del análogo. En realizaciones de ejemplo, los péptidos presentan una EC50 para la actividad de activación del receptor de GIP de aproximadamente 1  $\mu$ M o menos, o 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos. Se entiende que una EC50 más bajo indica una mayor actividad o potencia en el receptor. En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento presentan una EC50 en el receptor de GIP que es de aproximadamente 0,001 nM, 0,01 nM, o 0,1 nM. En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento muestran una EC50 en el receptor de GIP que es no más de aproximadamente 100 nM. La activación del receptor se puede medir mediante ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor, por ejemplo analizando las células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor y un gen de luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc tal como se describe en el Ejemplo 2.

[0053] En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en el presente documento muestran al menos aproximadamente 0,1%, 1%, 10%, 50%, 100%, 150% o 200% o más actividad en el receptor de GIP en relación con GIP natural (potencia de GIP). En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento no muestran más de 1000%, 10000%, 100000%, o 1.000.000% de la actividad en el receptor de GIP en relación con GIP natural. La actividad de un péptido de glucagón (potencia) en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de la EC50 para el péptido frente a el ligando natural.

[0054] Por lo tanto, un aspecto de la presente descripción proporciona péptidos y péptidos variantes que muestran actividad tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GIP ("coagonistas de glucagón/GIP"). En algunas realizaciones, la EC50 del péptido en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su EC50 en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido es menor de aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de glucagón. En algunas realizaciones, la actividad de GLP-1 se ha reducido significativamente o destruido, por ejemplo, mediante una modificación de aminoácidos en la posición 7, una delección de aminoácido o aminoácidos C-terminales al aminoácido en la posición 27 o 28, o una combinación de los mismos.

[0055] En aspectos alternativos de la presente descripción, los péptidos y péptidos variantes de la presente descripción muestran actividad en los receptores de GLP-1 y GIP, pero no muestran actividad significativa en el receptor de glucagón ("coagonistas de GIP/GLP-1"), por ejemplo, debido a una modificación de aminoácido de Gln en la posición 3. Por ejemplo, la sustitución en esta posición por un aminoácido ácido, básico o hidrófobo (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reduce la actividad de glucagón. En otros aspectos, los péptidos y péptidos variantes muestran actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GIP y GLP-1 ("triagonistas de glucagón/GIP/GLP-1"). Por ejemplo, en cualquiera de estos últimos aspectos, la EC50 del péptido en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su EC50 en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido es menor de aproximadamente 25, 20, 15, 10 o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de GLP-1. En algunas realizaciones, estos péptidos tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o mayor que aproximadamente 0,1%, pero menos de aproximadamente 10%.

#### Actividad de los conjugados

[0056] En algunas realizaciones, los péptidos y péptidos variantes descritos en este documento muestran una actividad o potencia en el receptor de glucagón y/o actividad en el receptor de GLP-1 y/o actividad en el receptor de GIP, tal como se describe anteriormente y, cuando el péptido o péptido variante es parte de un conjugado (por ejemplo, se conjuga con un grupo heterólogo, por ejemplo, un resto hidrófilo, por ejemplo, un polietilenglicol), el péptido o péptido variante muestra una actividad que es más baja (es decir, potencia inferior o EC50 superior) que cuando el péptido o péptido variante no es parte del conjugado. En algunos aspectos, el péptido o péptido variante cuando no forma parte del conjugado muestra una potencia en el receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1 que es de aproximadamente 10 veces o mayor que la potencia del péptido o péptido variante cuando forma parte de un conjugado. En algunos aspectos, el péptido o péptido variante cuando no está conjugado muestra una potencia en el receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1 que es aproximadamente 10 veces, aproximadamente 15 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 25 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 35 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 45 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 100 veces, o incluso más veces la potencia del péptido o péptido variante cuando se conjugan.

ESTRUCTURA DE LOS ANÁLOGOS DE GLUCAGONAcilación

5 [0057] Según algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado (por ejemplo, un aminoácido acilado no codificado (por ejemplo, un aminoácido que comprende un grupo acilo que es no natural a un aminoácido de origen natural). El aminoácido acilado, en algunas realizaciones, provoca que el análogo de glucagón tenga una o más de (i) una vida media prolongada en la circulación, (ii) un retraso en la aparición de la acción, (iii) una duración prolongada de acción, (iv) una resistencia mejorada a las proteasas, tales como DPP-IV, y (v) aumento de la potencia en uno o ambos de los receptores de GLP-1 y glucagón. Tal como se muestra en el presente documento, los análogos de glucagón acilados no muestran una disminución de la actividad en los receptores de glucagón y GLP-1 en comparación con el análogo de glucagón no acilado correspondiente. Más bien, en algunos casos, los análogos de glucagón acilados en realidad muestran mayor actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón. Por consiguiente, la potencia de los análogos de glucagón acilados es comparable con las versiones no aciladas de los análogos de glucagón, incluso mejorada.

15 [0058] Según una realización, el análogo de glucagón comprende un grupo acilo que se une al análogo de glucagón a través de un enlace éster, tioéster, o amida a los efectos de la prolongación de la vida media en circulación y/o el retraso de la aparición de y/o la ampliación de la duración de la acción y/o mejora de la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV.

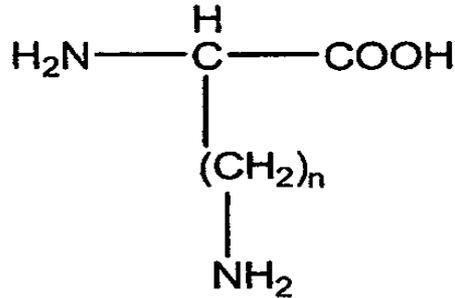
20 [0059] La acilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del análogo de glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición C-terminal al aminoácido 29 (por ejemplo, el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, etc., en una posición dentro de una extensión C-terminal o en el extremo C-terminal), a condición de que se mantenga la actividad de glucagón y/o actividad de GLP-1, incluso se mejore. Ejemplos no limitativos incluyen las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, o 29. En ejemplos de realización, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16, y 20. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 10, 12 y 16. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16, y 20. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más de las posiciones 10 y 12. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en la posición 12. En ejemplos de realización, el análogo de glucagón comprende una extensión C-terminal y un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 9, 10, 12, 16, 20, y 37-43 (por ejemplo, 40). En realizaciones específicas, la acilación se produce en la posición 10 del análogo de glucagón y el análogo de glucagón carece de un puente intramolecular, por ejemplo, un puente intramolecular covalente (por ejemplo, un puente de lactama). Tales análogos de glucagón acilados que carecen de un puente intramolecular muestran una mayor actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón en comparación con los correspondientes análogos no acilados que carecen de un puente intramolecular covalente y en comparación con los análogos correspondientes que carecen de un puente intramolecular acilado en una posición distinta de la posición 10. Tal como se muestra en el presente documento, la acilación en la posición 10 incluso puede transformar un análogo de glucagón que tiene poca actividad en el receptor de glucagón en un análogo de glucagón que tiene actividad tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GLP-1. En consecuencia, la posición en la que se produce la acilación puede alterar el perfil global de la actividad del análogo de glucagón.

35 [0060] El análogo del glucagón, en algunas realizaciones, se acila en la misma posición de aminoácido donde se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Los ejemplos no limitantes incluyen la acilación en la posición 10 y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del análogo de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 o 29, dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

40 [0061] El grupo acilo puede unirse covalentemente directamente a un aminoácido del análogo de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del análogo de glucagón a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido del análogo de glucagón y el grupo acilo.

45 [0062] En aspectos específicos, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante acilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón. En algunas realizaciones, la acilación está en la posición 10, 20, 24, o 29 del análogo de glucagón. En este sentido, el análogo de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en este documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 del análogo modificado por cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral. En algunas realizaciones específicas, la acilación directa del análogo de glucagón se produce a través de la amina, hidroxilo o tiol de la cadena lateral del aminoácido en la posición 10.

[0063] En algunas realizaciones, el aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral es un aminoácido de fórmula I:

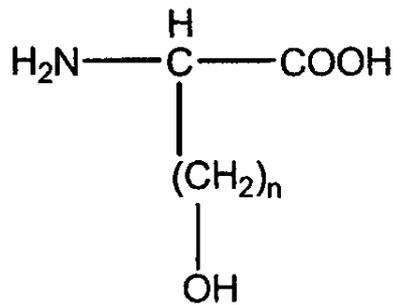


en la que n = 1 a 4

[Fórmula I]

[0064] En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula I, es el aminoácido en el que n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

[0065] En otras realizaciones, el aminoácido que comprende un grupo hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II:

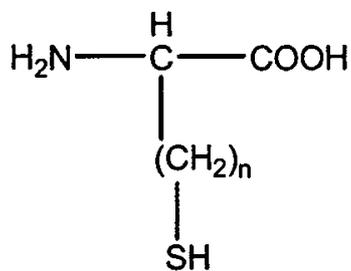


en la que n = 1 a 4

[Fórmula II]

[0066] En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Ser).

[0067] En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tiol en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula III:



en la que n = 1 a 4

[Fórmula III]

[0068] En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Cys).

[0069] En otras realizaciones, el aminoácido que comprende una una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de fórmula I, fórmula II o fórmula II, excepto que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de fórmula I, fórmula II o fórmula III está sustituido por una segunda

cadena lateral.

**[0070]** En algunas realizaciones, el glucagón acilado comprende un espaciador entre el análogo y el grupo acilo. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón está unido covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo acilo.

**[0071]** En algunas realizaciones, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral. El aminoácido al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprenda un grupo que permita la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , o  $-\text{COOH}$  en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En este sentido, el péptido de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, 29 y 40 modificado a cualquier aminoácido que comprende amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral.

**[0072]** En algunas realizaciones, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral, o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o carboxilato en la cadena lateral.

**[0073]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo amina de un espaciador, la acilación puede tener lugar a través de la amina alfa del aminoácido o una amina de la cadena lateral. En el caso en el que se acila la amina alfa, el aminoácido espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp, Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, ácido cisteico y ácido gamma-glutámico.

**[0074]** En el caso en el que se acila la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador, el aminoácido espaciador es un aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula I (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible acilar la amina alfa y la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador, de manera que el antagonista de glucagón se diacila. Las realizaciones de la descripción incluyen tales moléculas diaciladas.

**[0075]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo hidroxilo de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula II. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Ser.

**[0076]** Cuando la acilación se produce a través de un grupo tiol de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula III. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Cys.

**[0077]** En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófilo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato. En realizaciones específicas, el espaciador comprende un amino poli (alquilo) carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo,  $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ , en el que m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible comercialmente de Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

**[0078]** En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófobo. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, GT Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996). En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un carboxilato, y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxi octanoico y ácido 8-mercaptop octanoico.

**[0079]** En algunas realizaciones, el espaciador bifuncional no es un ácido dicarboxílico que comprende un metileno no ramificado de 1-7 átomos de carbono entre los grupos carboxilato. En algunas realizaciones, el espaciador bifuncional es un ácido dicarboxílico que comprende un metileno no ramificado de 1-7 átomos de carbono entre los grupos carboxilato.

**[0080]** El espaciador (por ejemplo, aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrófilo, o espaciador bifuncional hidrófobo) en realizaciones específicas tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos de, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, el espaciador tiene de aproximadamente 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo acilo es un grupo acilo graso C12 a C18, por ejemplo, un grupo acilo graso C14, un grupo acilo graso C16, de manera que la longitud total del espaciador y grupo acilo es de 14 a 28 átomos, por ejemplo, aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 átomos. En algunas realizaciones, la longitud del espaciador y grupo acilo es de 17 a 28 (por ejemplo, 19 a 26, 19 a 21) átomos.

**[0081]** Según ciertas realizaciones anteriores, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen natural (incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de los descritos en el presente documento) que comprende una cadena principal de aminoácido que tiene de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, y ácido 8-aminooctanoico). Alternativamente, el espaciador puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud. Cada aminoácido del espaciador dipéptido o tripéptido puede ser el mismo que o diferente de otro aminoácido o aminoácidos del dipéptido o tripéptido y puede seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: aminoácidos de origen natural o codificados y/o no codificados o de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los isómeros D o L de los aminoácidos de origen natural (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr), o cualquier isómero D o L de los aminoácidos de origen no natural seleccionados del grupo constituido por:  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -Ala), N- $\alpha$ -metil alanina (Me-Ala), ácido aminobutírico (Abu), ácido  $\gamma$ -aminobutírico ( $\gamma$ -Abu), ácido aminohexanoico ( $\epsilon$ -Ahx), ácido aminoisobutírico (Aib), ácido aminometilpirrolo-carboxílico, ácido aminopiperidincarboxílico, aminoserina (Ams), ácido aminotetrahidropirano-4- carboxílico, arginina N-metoxi-N-metil amida, ácido  $\beta$ -aspártico ( $\beta$ -Asp), ácido azetidincarboxílico, 3-(2-benzotiazolil) alanina,  $\alpha$ -terc-butilglicina, ácido 2-amino-5-ureido-n-valérico (citrulina, Cit),  $\beta$ -Ciclohexilalanina (Cha), acetamidometilo-cisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilalanina (DOPA), dimetiltiazolidina (DMTA), ácido  $\gamma$ -glutámico ( $\gamma$ -Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina (Hyp), isoleucina N-metoxi-N-metil amida, metil-isoleucina (Melle), ácido isonipecótico (ISN), metil-leucina (MeLeu), metil-lisina, dimetil- lisina, trimetil-lisina, metanoprolina, metionina-sulfóxido (Met(O)), metionina-sulfona (Met(O<sub>2</sub>)), norleucina (Nle), metil-norleucina (Me-Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), ácido para-aminobenzoico (PABA), penicilamina (Pen), metilfenilalanina (MePhe), 4-clorofenilalanina (Phe (4-Cl)), 4-fluorofenilalanina (Phe (4-F)), 4-nitrofenilalanina (Phe (4-NO<sub>2</sub>)), 4-cianofenilalanina ((Phe (4-CN)), fenilglicina (PHG), piperidinilalanina, piperidinilglicina, 3,4-deshidroprolina, pirrolidinilalanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), O-bencil-fosfoserina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Sta), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilalanina (Thi), O-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O-(bis-dimetilamino-fosfono)-tirosina, tirosina tetrabutilamina sulfato, metil-valina (MeVal), y ácido 3-mercaptopropiónico alquilado.

**[0082]** En algunas realizaciones, el espaciador comprende una carga global negativa, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones, el dipéptido no es ninguno de los dipéptidos de estructura general AB, donde A se selecciona del grupo que consiste en Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe y Pro, en el que B se selecciona entre el grupo que consiste en Lys, His, Trp. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido se selecciona del grupo que consiste en: Ala-Ala,  $\beta$ -Ala,  $\beta$ -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido  $\gamma$ -aminobutírico-ácido  $\gamma$ -aminobutírico, Glu-Glu y  $\gamma$ -Glu- $\gamma$ -Glu.

**[0083]** En algunas realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo, por acilación de una amina, hidroxilo o tiol de un espaciador, cuyo espaciador está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24, o 29, o en el aminoácido C-terminal del análogo de glucagón.

**[0084]** En realizaciones aún más específicas, el grupo acilo está unido al aminoácido en la posición 10 del análogo de glucagón y, opcionalmente, la longitud del espaciador y grupo acilo es de 14 a 28 átomos. El aminoácido en la posición 10, en algunos aspectos, es un aminoácido de Fórmula I, por ejemplo, Lys, o un aminoácido disustituido relacionado con la Fórmula I. En realizaciones más específicas, el análogo de glucagón carece de un puente intramolecular, por ejemplo, un puente intramolecular covalente. El análogo de glucagón, por ejemplo, puede ser un análogo de glucagón que comprende uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB, para la estabilización de la hélice alfa del análogo.

**[0085]** Los métodos adecuados de acilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos, y tioles son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19 (para los métodos de acilación a través de una amina), Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996); Shimohigashi y Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982); y Previero et al, Biochim Biophys Acta 263: 7-13. (1972) (para métodos de acilación a través de un hidroxilo); y San y Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (para los métodos de acilación a través de un tiol); Bioconjugate Chem.: "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" Páginas 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., Pharmaceutical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 pág.171-176 (1989).

[0086] El grupo acilo del péptido del aminoácido acilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones específicas, el grupo acilo es un ácido graso de C4 a C30. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de un ácido graso C4, ácido graso C6, ácido graso C8, ácido graso C10, ácidos grasos C12, ácido graso C14, ácido graso C16, ácido graso C18, ácido graso C20, ácido graso C22, ácido graso C24, ácido graso C26, ácido graso C28, o un ácido graso C30. En algunas realizaciones, el grupo acilo es un ácido graso C8 a C20, por ejemplo, un ácido graso C14 o un ácido graso C16.

[0087] En una realización alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo, pero no limitado a, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico, y ácido colesterol.

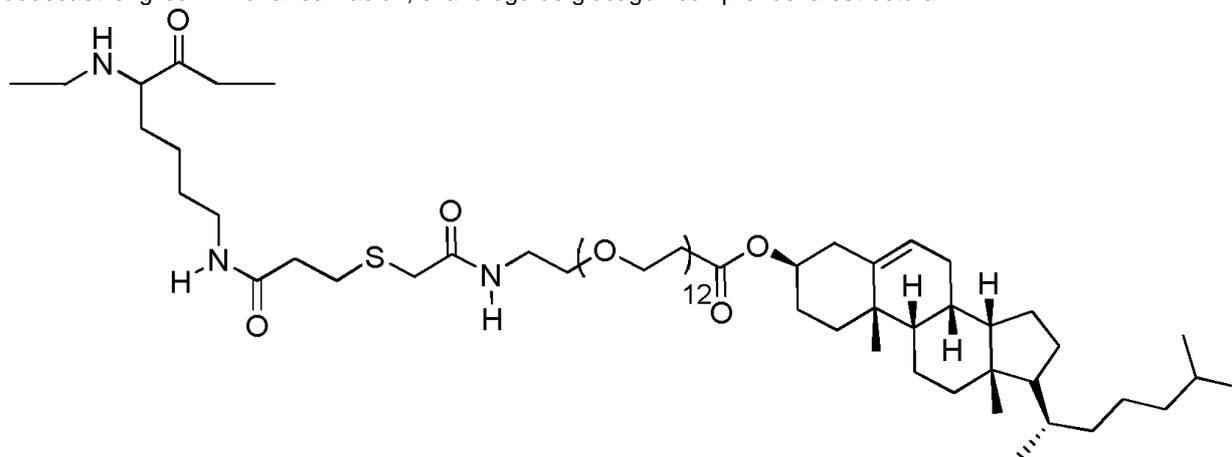
[0088] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado por acilación de un alcano de cadena larga por el análogo de glucagón. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol, y hexadecanotiol) que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del análogo de glucagón. El grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del análogo de glucagón pueden ser parte de una cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico) del análogo de glucagón o pueden ser parte de la cadena principal del análogo.

[0089] En ciertas realizaciones, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo por acilación de un alcano de cadena larga por un separador que se une al análogo de glucagón. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del espaciador. Los espaciadores adecuados que comprenden un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, espaciadores bifuncionales, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos.

[0090] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "forma activada de un grupo carboxilo" se refiere a un grupo carboxilo con la fórmula general R(C=O)X, en donde X es un grupo saliente y R es el péptido de glucagón o el espaciador. Por ejemplo, las formas activadas de un grupo carboxilo pueden incluir, pero no se limitan a, cloruros de acilo, anhídridos, y ésteres. En algunas realizaciones, el grupo carboxilo activado es un éster con un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) como grupo saliente.

[0091] Con respecto a estos aspectos, en el que se acila un alcano de cadena larga por el análogo de glucagón o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbono. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano C4 a C30. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un alcano C4, alcano C6, alcano C8, alcano C10, alcano C12, alcano C14, alcano C16, alcano C18, alcano C20, alcano C22, alcano C24, alcano C26, alcano C28, o un alcano C30. En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C8 a C20, por ejemplo, un alcano C14, alcano C16, o un alcano C18.

[0092] Además, en algunas realizaciones, se acila una amina, hidroxilo, o grupo tiol del análogo de glucagón con un ácido colesterol. En realizaciones específicas, el análogo de glucagón está unido con el ácido colesterol a través de un espaciador de Cys modificado, es decir, un espaciador de ácido 3-mercaptopropiónico alquilado. El espaciador de des-amino Cys alquilado puede ser, por ejemplo, un espaciador de des-amino Cys que comprende un grupo dodecaetilenglicol. En una realización, el análogo de glucagón comprende la estructura:



[0093] Los análogos de glucagón acilados descritos en este documento se pueden modificar adicionalmente para comprender un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones específicas, el grupo hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un grupo hidrófilo se puede realizar a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en este documento. En este sentido, el péptido de

glucagón acilado puede comprender la SEQ ID NO: 1, incluyendo cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 del análogo comprende un grupo acilo y al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24, ó 29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, se modifican a una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un grupo hidrófilo (por ejemplo, PEG). En algunas realizaciones, el grupo acilo está unido a la posición 10, opcionalmente a través de un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y el grupo hidrófilo se incorpora en un residuo de Cys en la posición 24.

10 **[0094]** Alternativamente, el análogo de glucagón acilado puede comprender un espaciador, en el que el espaciador está acilado y modificado para comprender el grupo hidrófilo. Los ejemplos no limitantes de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, y Ac-Phe.

### 15 Alquilación

**[0095]** De acuerdo con algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado (por ejemplo, un aminoácido no codificado alquilado (por ejemplo, un aminoácido que comprende un grupo alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural)). Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la alquilación de análogos de glucagón logran efectos similares, si no el mismo, que la acilación de los análogos de glucagón, por ejemplo, una vida media prolongada en la circulación, un retraso en la aparición de la acción, una duración prolongada de la acción, una resistencia mejorada a las proteasas, tales como DPP-IV, y un aumento de la potencia en los receptores de GLP-1 y de glucagón.

25 **[0096]** La alquilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro del análogo del glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones descritas en el presente documento como un sitio para la acilación, incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de las posiciones de aminoácidos 1-29, una posición de aminoácido C-terminal al residuo 29, por ejemplo, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, etc., en una posición dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal, siempre que se mantenga la actividad de glucagón o la actividad de GLP-1. Ejemplos no limitativos incluyen las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, o 29. En ejemplos de realización, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16, y 20. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 10, 12 y 16. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16, y 20. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones 10 y 12. En realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en la posición 12. En ejemplos de realización, el análogo de glucagón comprende una extensión C-terminal y un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 9, 10, 12, 16, 20, y 37-43 (por ejemplo, 40). El grupo alquilo puede estar unido covalentemente directamente a un aminoácido del análogo de glucagón, o indirectamente a un aminoácido del análogo de glucagón a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido del análogo de glucagón y el grupo alquilo. El análogo de glucagón puede alquilarse en la misma posición de aminoácido donde se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Ejemplos no limitantes incluyen la alquilación en la posición 10 y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del análogo de glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 o 29, dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

50 **[0097]** En aspectos específicos, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación directa de una amina, hidroxilo, o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón. En algunas realizaciones, la alquilación es en la posición 10, 20, 24, ó 29 del análogo de glucagón. En este sentido, el análogo de glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, ó 29 modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol en la cadena lateral. En algunas realizaciones específicas, la alquilación directa del análogo de glucagón se produce a través de la amina, hidroxilo, o tiol de la cadena lateral del aminoácido en la posición 10.

60 **[0098]** En algunas realizaciones, el aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula I. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula I es el aminoácido en el que n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

65 **[0099]** En otras realizaciones, el aminoácido que comprende un hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el ácido amino en el que n es 1 (Ser).

**[0100]** En aún otras realizaciones, el aminoácido que comprende un tiol en la cadena lateral es un aminoácido de

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

5 **[0101]** En otras realizaciones, el aminoácido que comprende una amina hidroxilo, o tiol en la cadena lateral, es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, excepto que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de Fórmula I, Fórmula II, o fórmula III se sustituye por una segunda cadena lateral.

10 **[0102]** En algunas realizaciones, el análogo de glucagón alquilado comprende un espaciador entre el análogo y el grupo alquilo. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón se une covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo alquilo. En algunas realizaciones de ejemplo, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación de una amina, hidroxilo, o tiol de un espaciador, cuyo espaciador está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24, ó 29 del análogo de glucagón. El aminoácido al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprende un grupo que permite la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , o  $-\text{COOH}$  en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En este sentido, el análogo de glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato en la cadena lateral.

20 **[0103]** En algunas realizaciones, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo, o tiol en la cadena lateral.

25 **[0104]** Cuando la alquilación se produce a través de un grupo amina de un espaciador, la alquilación puede tener lugar a través de la amina alfa del aminoácido o una amina de la cadena lateral. En el caso en el que la amina alfa está alquilada, el aminoácido espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu. En el caso en el que la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador está alquilada, el aminoácido espaciador es un aminoácido que comprende una amina de la cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula I (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible alquilar la amina alfa y la amina de la cadena lateral del aminoácido espaciador, de manera que el análogo de glucagón se dialquila. Las realizaciones de la invención incluyen tales moléculas dialquiladas.

35 **[0105]** Cuando la alquilación se produce a través de un grupo hidroxilo de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula II. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Ser.

40 **[0106]** Cuando la alquilación se produce a través de un grupo tiol de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula III. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Cys.

45 **[0107]** En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófilo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato. En realizaciones específicas, el espaciador comprende un amino poli (alquilo) carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo,  $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$ , en el que m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible comercialmente de Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

55 **[0108]** En algunas realizaciones, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrófobo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un grupo tiol y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxiocetanoico y ácido 8-mercaptooctanoico.

60 **[0109]** El espaciador (por ejemplo, aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrófilo, o espaciador bifuncional hidrófobo) en realizaciones específicas tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos de, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, el espaciador tiene de aproximadamente 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo alquilo es un grupo alquilo C12

a C18, por ejemplo, un grupo alquilo C14, un grupo alquilo C16, de manera que la longitud total del espaciador y grupo alquilo es de 14 a 28 átomos, por ejemplo, aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 átomos. En algunas realizaciones, la longitud del espaciador y grupo alquilo es de 17 a 28 (por ejemplo, 19 a 26, 19 a 21) átomos.

5 [0110] Según ciertas realizaciones anteriores, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen no natural o no codificado que comprende una cadena principal de aminoácido que tiene de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, y ácido 8-aminooctanoico). Alternativamente, el espaciador puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una  
10 cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud. El espaciador dipéptido o tripéptido puede estar compuesto de aminoácidos naturales o codificados y/o no codificados o no naturales, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos indicados en el presente documento. En algunas realizaciones, el espaciador comprende una carga global negativa, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido se selecciona del grupo que consiste en:  
15 Ala-Ala, β-Ala, β-Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido γ-aminobutírico-ácido γ-aminobutírico, y γ-Glu-γ-Glu.

[0111] Los procedimientos adecuados de alquilación de péptido a través de aminas, hidroxilos, tioles y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una síntesis de éter de Williamson para formar un enlace éter entre un grupo hidroxilo del análogo de glucagón y el grupo alquilo. Además, una reacción de sustitución nucleófila del péptido con un haluro de alquilo puede dar lugar a cualquiera de un enlace éter, tioéter, o amino.  
20

[0112] El grupo alquilo del análogo de glucagón alquilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, una cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C4 a C30. Por ejemplo, el grupo alquilo puede ser cualquiera de un grupo alquilo C4, alquilo C6, alquilo C8, alquilo C10, alquilo C12, alquilo C14, alquilo C16, alquilo C18, alquilo C20, alquilo C22, alquilo C24, alquilo C26, alquilo C28, o un alquilo C30. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C8 a C20, por ejemplo, un alquilo C14 o un alquilo C16.  
25

[0113] En algunas realizaciones específicas, el grupo alquilo comprende un grupo esteroide de un ácido biliar, por ejemplo, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico, y ácido colesterol.  
30

[0114] En algunas realizaciones de la descripción, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado por reacción de un alcano nucleófilo de cadena larga con el análogo de glucagón, en el que el análogo de glucagón comprende un grupo saliente adecuado para la sustitución nucleófila. En aspectos específicos, el grupo nucleófilo del alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol, y hexadecanotiol). El grupo saliente del análogo de glucagón puede ser parte de una cadena lateral de un aminoácido o puede ser parte de la cadena principal del péptido. Los grupos salientes adecuados incluyen, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida, halógenos, y ésteres de sulfonato.  
35

[0115] En ciertas realizaciones, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo haciendo reaccionar el alcano nucleófilo de cadena larga con un espaciador que está unido al análogo de glucagón, en el que el espaciador comprende el grupo saliente. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol. En ciertas realizaciones, el espaciador que comprende el grupo saliente puede ser cualquier espaciador discutido en el presente documento, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos que comprende además un grupo saliente adecuado.  
40

[0116] Con respecto a estos aspectos de la invención, en el que un alcano de cadena larga es alquilado por el análogo de glucagón o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbono. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano C4 a C30. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un alcano C4, alcano C6, alcano C8, alcano C10, alcano C12, alcano C14, alcano C16, alcano C18, alcano C20, alcano C22, alcano C24, alcano C26, alcano C28, o un alcano C30. En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C8 a C20 alcano, por ejemplo, un alcano C14, alcano C16, o un alcano C18.  
45

[0117] Además, en algunas realizaciones, la alquilación puede tener lugar entre el análogo de glucagón y un resto de colesterol. Por ejemplo, el grupo hidroxilo del colesterol puede desplazar un grupo saliente en el alcano de cadena larga para formar un producto colesterol- análogo de glucagón.  
50

[0118] Los análogos de glucagón alquilados descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para comprender un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones específicas, el grupo hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un grupo hidrófilo se puede lograr a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en el presente documento. En este sentido, el análogo de glucagón alquilado puede comprender una SEQ ID NO: 1 modificada que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en este documento, en el que al menos uno de los aminoácidos en las  
55

posiciones 10, 20, 24, y 29 comprenden un grupo alquilo y al menos uno de los aminoácidos en la posición 16, 17, 21, 24, y 29, una posición dentro de una extensión C-terminal o el aminoácido C-terminal se modifican a una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un grupo hidrófilo (por ejemplo, PEG). En algunas realizaciones, el grupo alquilo está unido a la posición 10, opcionalmente a través de un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y el grupo hidrófilo se incorpora en un residuo de Cys en la posición 24.

**[0119]** Alternativamente, el análogo de glucagón alquilado puede comprender un espaciador, donde el espaciador está alquilado y modificado para comprender el grupo hidrófilo. Ejemplos no limitantes de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, y Ac-Phe.

#### Estabilización de la hélice alfa y aminoácidos que inducen la hélice alfa

**[0120]** Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los análogos de glucagón descritos en este documento comprenden una estructura helicoidal, por ejemplo, una hélice alfa. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende aminoácidos que estabilizan la estructura helicoidal alfa. Por consiguiente, en algunos aspectos, el análogo de glucagón comprende uno o más aminoácidos que inducen la hélice alfa. Tal como se utiliza en este documento, el término "aminoácido que induce la hélice alfa" se refiere a un aminoácido que proporciona mayor estabilidad a una hélice alfa del análogo de glucagón de la que es una parte. Los aminoácidos que inducen la hélice alfa son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Lyu et al, Proc Natl Acad Sci U.S.A. 88: 5317-5320 (1991); Branden y Tooze, Introduction to Protein Structure, Garland Publishing, Nueva York, Nueva York, 1991; Fasman, Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, ed. Fasman, Plenum, NY, 1989). Los aminoácidos que inducen la hélice alfa adecuados para los propósitos en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: alanina, norvalina, norleucina, ácido alfa aminobutírico, ácido alfa-aminoisobutírico, leucina, isoleucina, valina, y similares. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa es cualquier aminoácido que es parte de una hélice alfa que se encuentra en una proteína de origen natural, por ejemplo, Leu, Phe, Ala, Met, Gly, Ile, Ser, Asn, Glu, Asp, Lys, Arg.

**[0121]** En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa proporciona más estabilidad a la hélice alfa en comparación con la glicina o alanina. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa es un aminoácido alfa, alfa disustituido, por ejemplo, AIB.

#### Hélice alfa: Posición de los aminoácidos que inducen la hélice alfa

**[0122]** En algunas realizaciones de la presente descripción, el análogo de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos que es similar al glucagón natural (SEQ ID NO: 1) y el análogo de glucagón comprende al menos un aminoácido que induce una hélice alfa. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce una hélice alfa se encuentra en cualquiera de las posiciones 12 a 29 (según la numeración del glucagón natural (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 1 y comprende al menos un aminoácido que induce una hélice alfa, por ejemplo, en una o más de las posiciones 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un aminoácido que induce la hélice alfa en una, dos, tres, o la totalidad de las posiciones 16, 17, 20, y 21.

#### Hélice alfa: Aminoácidos alfa, alfa-disustituidos

**[0123]** En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa es un aminoácido alfa, alfa di-sustituido. En realizaciones específicas, el aminoácido alfa, alfa di-sustituido comprende  $R^1$  y  $R^2$ , cada uno de los cuales está unido al carbono alfa, en el que cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquilo C1-C4, opcionalmente sustituido con un hidroxilo, amida, tiol, halo, o  $R^1$  y  $R^2$  junto con el carbono alfa al que están unidos forman un anillo (por ejemplo, un anillo C3-C8). En algunas realizaciones, cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  se selecciona del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo y n-butilo, o  $R^1$  y  $R^2$  juntos forman un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En algunas realizaciones,  $R^1$  y  $R^2$  son los mismos. En algunas realizaciones,  $R^1$  es diferente de  $R^2$ . En ciertos aspectos, cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  es un alquilo C1-C4. En algunos aspectos, cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  es un alquilo C1 o C2. En algunas realizaciones, cada uno de  $R^1$  y  $R^2$  es metilo, de manera que el aminoácido alfa, alfa di-sustituido es ácido alfa-aminoisobutírico (AIB).

**[0124]** En algunos aspectos, los análogos de glucagón descritos en este documento comprenden uno o más aminoácidos alfa, alfa di-sustituidos y los análogos de glucagón carecen específicamente de un puente intramolecular covalente (por ejemplo, una lactama), ya que el aminoácido alfa, alfa-disustituido es capaz de estabilizar la hélice alfa en ausencia de un puente covalente. En algunos aspectos, el análogo de glucagón comprende uno o más aminoácidos alfa, alfa di-sustituidos en el C-terminal (alrededor de las posiciones 12 a 29). En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28 o 29 del análogo de glucagón está sustituida por un aminoácido alfa, alfa disustituido, por ejemplo, ácido amino iso-butírico (AIB), un aminoácido disustituido con el mismo o un grupo diferente seleccionado entre metilo, etilo, propilo y n-butilo, o con

un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 por AIB aumenta la actividad de GLP-1, en ausencia de un puente intramolecular, por ejemplo, un puente intramolecular no covalente (por ejemplo, un puente salino) o un puente intramolecular covalente (por ejemplo, una lactama). En algunas realizaciones, una, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 ó 24 están sustituidas por AIB. En realizaciones específicas, uno o ambos de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 2, 16 de glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1) se sustituyen por un aminoácido alfa, alfa disustituido, tal como AIB.

**[0125]** De acuerdo con algunas realizaciones, el análogo de glucagón que carece de un puente intramolecular comprende una o más sustituciones dentro de las posiciones de aminoácidos 12-29 con un aminoácido alfa, alfa-disustituido y un grupo acilo o alquilo unido covalentemente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo de glucagón. En realizaciones específicas, el grupo acilo o alquilo no es de origen natural en un aminoácido. En ciertos aspectos, el grupo acilo o alquilo no es natural para el aminoácido en la posición 10. Tales péptidos similares a glucagón acilados o alquilados que carecen de un puente intramolecular muestran mayor actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón en comparación con los péptidos homólogos no acilados. Una mayor mejora en la actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón se puede lograr por los péptidos similares a glucagón acilados que carecen de un puente intramolecular mediante la incorporación de un espaciador entre el grupo acilo o alquilo y la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo. La acilación y alquilación, incorporando o no espaciadores, se describen adicionalmente en este documento.

#### Hélice alfa: puentes intramoleculares

**[0126]** En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa es un aminoácido que está unido a otro aminoácido del análogo de glucagón a través de un puente intramolecular. En dichas realizaciones, cada uno de estos dos aminoácidos unidos a través de un puente intramolecular se considera un aminoácido que induce la hélice alfa. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende uno o dos puentes intramoleculares. En algunas realizaciones específicas, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular en combinación con al menos otro aminoácido que induce al hélice alfa, por ejemplo, un aminoácido alfa, alfa disustituido.

**[0127]** En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente que conecta dos partes del análogo de glucagón a través de enlaces no covalentes, incluyendo, por ejemplo, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo, y similares. En este sentido, el análogo de glucagón, en ciertos aspectos, comprende un puente intramolecular no covalente. En algunas realizaciones, el puente intramolecular no covalente es un puente salino.

**[0128]** En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente que conecta dos partes del análogo a través de enlaces covalentes. En este sentido, en ciertos aspectos, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular covalente.

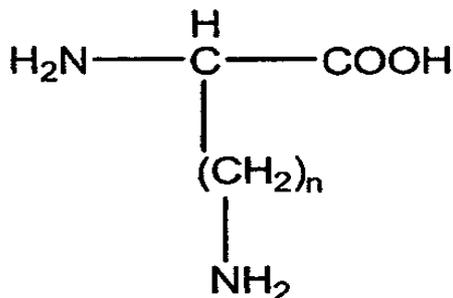
**[0129]** En algunas realizaciones, se forma el puente intramolecular (por ejemplo, puente intramolecular no covalente, puente intramolecular covalente) entre dos aminoácidos que están separados 3 aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$ , en los que  $i$  es cualquier número entero entre 12 y 25 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, y 25). Más particularmente, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24 o 24 y 28 (pares de aminoácidos en los que  $i = 12, 16, 20, \text{ o } 24$ ) están unidas entre sí y, de este modo, estabilizan la hélice alfa del glucagón. Alternativamente,  $i$  puede ser 17. En algunas realizaciones específicas, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular entre los aminoácidos 17 y 21. En algunas realizaciones específicas, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 o 12 y 16 y un segundo puente intramolecular entre los aminoácidos en las posiciones 17 y 21. En el presente documento se contemplan los análogos de glucagón que comprenden uno o más puentes intramoleculares. En realizaciones específicas, en las que los aminoácidos en las posiciones  $i$  e  $i + 4$  están unidos por un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 8 átomos, o aproximadamente 7-9 átomos.

**[0130]** En otras realizaciones, el puente intramolecular se forma entre dos aminoácidos que están separados dos aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$ , en los que  $j$  es cualquier número entero entre 12 y 26 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26). En algunas realizaciones específicas,  $j$  es 17. En realizaciones específicas, en las que los aminoácidos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$  están unidos por un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 6 átomos, o aproximadamente 5 a 7 átomos.

**[0131]** En otras realizaciones, se forma el puente intramolecular entre dos aminoácidos que están separados 6 aminoácidos, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones  $k$  y  $k + 7$ , en las que  $k$  es cualquier número entero entre 12 y 22 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, y 22). En algunas realizaciones específicas,  $k$  es 12, 13, o 17. En una realización de ejemplo,  $k$  es 17.

#### Hélice alfa: aminoácidos implicados en puentes intramoleculares

[0132] Entre los ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse (covalentemente o no covalentemente) para formar un puente que une seis átomos se incluyen Orn y Asp, Glu y un aminoácido de la fórmula I, en la que n es 2, y ácido homoglutámico y un aminoácido de la fórmula I, en la que n es 1, en la que la Fórmula I es:



en la que n = 1 a 4

[Fórmula I]

[0133] Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente de unión que tiene siete átomos incluyen Orn-Glu (lactama); Lys-Asp (lactama); o Homoser-Homoglu (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de ocho átomos incluyen Lys-Glu (lactama); Homolys-Asp (lactama); Orn-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe- Asp (lactama); o Tyr-Asp (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de nueve átomos incluyen Homolys-Glu (lactama); Lys-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe-Glu (lactama); o Tyr-Glu (lactona). Cualquiera de las cadenas laterales de estos aminoácidos puede estar sustituida adicionalmente con grupos químicos adicionales, siempre y cuando la estructura tridimensional de la hélice alfa no se interrumpa. Un experto en la técnica puede imaginar emparejamientos alternativos o análogos de aminoácidos alternativos, incluyendo derivados modificados químicamente, que crearían una estructura estabilizadora de tamaño similar y efecto deseado. Por ejemplo, un puente disulfuro homocisteína-homocisteína tiene 6 átomos de longitud y se puede modificar adicionalmente para proporcionar el efecto deseado.

[0134] Incluso sin enlace covalente, los emparejamientos de aminoácidos descritos anteriormente (o emparejamientos similares que un experto en la técnica puede imaginar) también pueden proporcionar estabilidad añadida a la hélice alfa a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, mediante la formación de puentes salinos o interacciones de puentes de hidrógeno. Por consiguiente, se pueden formar puentes salinos entre: Orn y Glu; Lys y Asp; Homo-serina y Homo-glutamato; Lys y Glu; Asp y Arg; Homo-Lys y Asp; Orn y Homo-glutamato; 4-aminoPhe y Asp; Tyr y Asp; Homo-Lys y Glu; Lys y Glu-Homo; 4-aminoPhe y Glu; o Tyr y Glu. En algunas realizaciones, el análogo comprende un puente salino entre cualquiera de los siguientes pares de aminoácidos: Orn y Glu; Lys y Asp; Lys y Glu; Asp y Arg; Homo-Lys y Asp; Orn y Homo-glutamato; Homo-Lys y Glu; y Lys y Glu-Homo. Los puentes salinos se pueden formar entre otros pares de cadenas laterales de carga opuesta. Véase, por ejemplo, Kallenbach et al, Role of the Peptide Bond in Protein Structure and Folding, en The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry and Materials Science, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

[0135] En algunas realizaciones, el puente intramolecular no covalente es un puente hidrófobo. De acuerdo con una realización, la hélice alfa del análogo se estabiliza mediante la incorporación de aminoácidos hidrófobos en las posiciones  $j$  y  $j + 3$  o  $i$  y  $i + 4$ . Por ejemplo,  $i$  puede ser Tyr e  $i + 4$  puede ser Val o Leu;  $i$  puede ser Phe e  $i + 4$  puede ser Met; o  $i$  puede ser Phe e  $i + 4$  puede ser Ile. Debe entenderse que, para los propósitos del presente documento, los emparejamientos de aminoácidos anteriores se pueden invertir, de manera que el aminoácido indicado en la posición  $i$ , alternativamente, podría estar situado en  $i + 4$ , mientras que el aminoácido  $i + 4$  puede estar situado en la posición  $i$ . También debe entenderse que se pueden formar emparejamientos de aminoácidos adecuados para  $j$  y  $j + 3$ .

#### Hélice alfa: puente intramolecular covalente

[0136] En algunas realizaciones, el puente intramolecular covalente es un anillo de lactama o un puente de lactama. El tamaño del anillo de lactama puede variar dependiendo de la longitud de las cadenas laterales de aminoácidos, y en una realización, la lactama está formada por la unión de las cadenas laterales de una ornitina a una cadena lateral de ácido aspártico. Los puentes de lactama y procedimientos de fabricación de los mismos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Houston, Jr., et al, J Peptide Sci. 1: 274-282 (2004), y el Ejemplo 1 en el presente documento. En algunas realizaciones, el análogo comprende una secuencia modificada de la SEQ ID NO: 1 y un puente de lactama entre  $i$  y  $i + 4$ , en el que  $i$  es tal como se define en este documento anteriormente. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende dos puentes de lactama: uno entre los aminoácidos en las

posiciones 16 y 20 y otro entre los aminoácidos en las posiciones 17 y 21. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un puente de lactama y un puente salino. Otras realizaciones de ejemplo se describen en el presente documento en la sección titulada "EJEMPLOS". Otras realizaciones de ejemplo incluyen los siguientes emparejamientos, opcionalmente con un puente de lactama: Glu en la posición 12 con Lys en la posición 16; Lys natural en la posición 12 con Glu en la posición 16; Glu en la posición 16 con Lys en la posición 20; Lys en la posición 16 con Glu en la posición 20; Glu en la posición 20 con Lys en la posición 24; Lys en la posición 20 con Glu en la posición 24; Glu en la posición 24 con Lys en la posición 28; Lys en la posición 24 con Glu en la posición 28.

[0137] En algunas realizaciones, el puente intramolecular covalente es una lactona. Los procedimientos adecuados para producir un puente de lactona son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sheehan et al, J Am Chem Soc. 95: 875-879 (1973).

[0138] En algunos aspectos, se utiliza la metátesis de olefinas para reticular uno o dos giros de la hélice alfa del análogo utilizando un sistema de reticulación de todos los hidrocarburos. El análogo de glucagón en este caso comprende aminoácidos  $\alpha$ -metilados que llevan cadenas laterales olefínicas de longitud variable y configurados con estereoquímica R o S en las posiciones  $j$  y  $j + 3$  o  $i$  e  $i + 4$ . En algunas realizaciones, la parte olefínica comprende  $(CH_2)_n$ , en el que  $n$  es cualquier número entero entre 1 a 6. En algunas realizaciones,  $n$  es 3 para una longitud de reticulación de 8 átomos. En algunas realizaciones,  $n$  es 2 para una longitud de reticulación de 6 átomos. Un análogo de glucagón de ejemplo que comprende un reticulación olefínica se describe en el presente documento como SEQ ID NO: 17. Los procedimientos adecuados para la formación de tales puentes intramoleculares se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000) y Walensky et al, Science 305: 1466-1470 (2004). En realizaciones alternativas, el análogo comprende residuos de O-alil Ser situados en giros helicoidales adyacentes, que están puenteados entre sí a través de la metátesis de cierre de anillo catalizada por rutenio. Dichos procedimientos de reticulación se describen en, por ejemplo, Blackwell et al., Angew, Chem., Int. Ed. 37: 3281-3284 (1998).

[0139] En aspectos específicos, el uso del aminoácido tio-dialanina no natural, lantionina, que ha sido ampliamente adoptado como un peptidomimético de cistina, se utiliza para reticular un giro de la hélice alfa. Los procedimientos adecuados de ciclación a base de lantionina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Matteucci et al, Tetrahedron Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., J. Peptide Res. 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., J. Med. Chem. 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., J. Med. Chem. 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., Bull. Chem. Soc. JPN. 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., J. Org. Chem. 36: 73-80 (1971); Goodman y Shao, Appl puro. Chem. 68: 1303-1308 (1996); y Osapay y Goodman, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1599-1600 (1993).

[0140] En algunas realizaciones, las uniones  $\alpha,\omega$ -diaminoalcano, por ejemplo, 1,4-diaminopropano y 1,5-diaminopentano, entre dos residuos de Glu en las posiciones  $i$  e  $i + 7$  se utilizan para estabilizar la hélice alfa del análogo. Dichas uniones conducen a la formación de un puente de 9 átomos de longitud o más, dependiendo de la longitud de la unión de diaminoalcano. Los procedimientos adecuados para la producción de péptidos reticulados con dichas uniones se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Phelan et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997).

[0141] En otras realizaciones, se utiliza un puente disulfuro para reticular uno o dos giros de la hélice alfa del análogo. Alternativamente, se utiliza un puente de disulfuro modificado en el que uno o ambos átomos de azufre se sustituyen por un grupo metileno que da lugar a una macrociclación isostérica para estabilizar la hélice alfa del análogo. Los procedimientos adecuados de la modificación de péptidos con puentes disulfuro o ciclación a base de azufre se describen, por ejemplo, en Jackson et al., J. Am. Chem. Soc. 113: 9.391-9.392 (1991) y Rudinger y Jost, Experientia 20: 570-571 (1964).

[0142] En otras realizaciones, la hélice alfa del análogo se estabiliza a través de la unión del átomo de metal por dos residuos de His o un par de His y Cys situado en  $j$  y  $j + 3$ , o  $i$  e  $i + 4$ . El átomo de metal puede ser, por ejemplo, Ru (III), Cu (II), Zn (II), o Cd (II). Tales procedimientos de estabilización de hélice alfa a base de unión a metal son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Andrews y Tabor, Tetrahedron 55: 11711 a 11743 (1999); Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 1630-1632 (1990); y Ghadiri et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 9063 a 9064 (1997).

[0143] La hélice alfa del análogo puede alternativamente estabilizarse a través de otros medios de ciclación de péptidos, cuyo significado se revisa en Davies, J. Peptide. Sci. 9: 471-501 (2003). La hélice alfa se puede estabilizar mediante la formación de un puente de amida, puente de tioéter, puente de tioéster, puente de urea, puente de carbamato, puente de sulfonamida, y similares. Por ejemplo, se puede formar un puente de tioéster entre el extremo C-terminal y la cadena lateral de un residuo de Cys. Alternativamente, se puede formar un tioéster a través de cadenas laterales de aminoácidos que tienen un tiol (Cys) y un ácido carboxílico (por ejemplo, Asp, Glu). En otro procedimiento, un agente de reticulación, tal como un ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido subérico (ácido octanodioico), etc. puede introducir un enlace entre dos grupos funcionales de una cadena lateral de aminoácido, tal como un amino libre, hidroxilo, grupo tiol, y combinaciones de los mismos.

Péptidos resistentes a DPP-IV

[0144] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende en la posición 1 o 2, o en ambas posiciones 1 y 2, un aminoácido que logra la resistencia del análogo de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende en la posición 1 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina, N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, o ácido alfa,alfa-dimetil imidiazol acético (DMIA). En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende en la posición 2 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina, N-metil alanina, o ácido alfa-aminoisobutírico. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende en la posición 2 un aminoácido que alcanza la resistencia del análogo de glucagón a DPP IV y el aminoácido que logra la resistencia del análogo de glucagón a DPP IV no es D-serina.

[0145] En algunos aspectos, el análogo de glucagón que comprende un aminoácido que alcanza la resistencia del análogo de glucagón a DPP IV comprende además una modificación de aminoácido que estabiliza la hélice alfa que se encuentra en la parte C-terminal de glucagón, por ejemplo, a través de un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones "i" y "i + 4", por ejemplo, 12 y 16, 16 y 20, o 20 y 24. En algunas realizaciones, este enlace covalente es un puente de lactama entre un ácido glutámico en la posición 16 y una lisina en la posición 20. En algunas realizaciones, este enlace covalente es un puente intramolecular que no es un puente de lactama. Por ejemplo, los procedimientos de unión covalente adecuados incluyen uno cualquiera o más de metátesis de olefinas, ciclación a base de lantionina, formación de puentes disulfuro o formación de puentes que contienen azufre modificados, el uso de enlaces  $\alpha,\omega$ -diaminoalcano, la formación de puentes de átomos metálicos y otros medios de ciclación de péptidos.

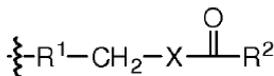
#### Modificación en la Posición 1

[0146] En algunas realizaciones específicas, el análogo de glucagón comprende (a) una sustitución de aminoácido de His en la posición 1 por un aminoácido aromático grande y (b) un puente intramolecular que estabiliza que la hélice alfa en la parte C-terminal de la molécula (por ejemplo, alrededor de las posiciones 12-29). En realizaciones específicas, el aminoácido en la posición 1 se sustituye por Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, cloro-Phe, sulfophe, 4-piridil-Ala, metil-Tyr, o 3-amino Tyr. El puente intramolecular, en algunas realizaciones, es cualquiera de los descritos en este documento. En algunos aspectos, el puente intramolecular está entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que están separados por tres aminoácidos intermedios, es decir, entre las cadenas laterales de los aminoácidos i y i + 4. En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente de lactama. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un aminoácido aromático grande en la posición 1 y un puente de lactama entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 del análogo. Dicho análogo de glucagón, en algunos aspectos, comprende además uno o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco o más) de las otras modificaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el análogo de glucagón puede comprender una amida en lugar del carboxilato C-terminal. Además, en algunas realizaciones, dichos análogos de glucagón comprenden además uno o más de un aminoácido alifático grande en la posición 17, un aminoácido que contiene imidazol en la posición 18 y un aminoácido de carga positiva en la posición 19. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón que comprende una modificación en la posición 1 y un puente intramolecular comprende además la secuencia de aminoácidos Ile-His-Gln en las posiciones 17-19. Tales modificaciones pueden realizarse sin destruir la actividad del análogo de glucagón en el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende adicionalmente un residuo de aminoácido acilado o alquilado.

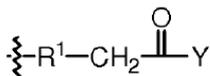
#### Modificación en la Posición 3

[0147] En algunas realizaciones, el tercer aminoácido de SEQ ID NO: 1 (Gln3) está sustituido por un residuo de aminoácido de carácter ácido, básico, o hidrófobo y dicha modificación hace que se reduzca la actividad del receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el aminoácido de carácter ácido, básico, o hidrófobo es ácido glutámico, ornitina, norleucina. En algunos aspectos, la modificación por uno de estos residuos ha llevado al análogo de glucagón a mostrar una actividad del receptor de glucagón sustancialmente reducida o destruida. Los análogos de glucagón que están sustituidos por, por ejemplo, ácido glutámico, ornitina, o norleucina, en algunos aspectos, tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o más de aproximadamente 0,1% pero menos de aproximadamente 10%, mientras que muestran al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, los análogos de glucagón muestran aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1% o aproximadamente el 7% de la actividad del glucagón natural, mientras que muestran al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

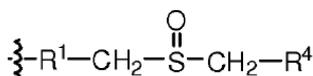
[0148] En algunas realizaciones, la glutamina en la posición 3 de SEQ ID NO: 1 del análogo de glucagón está sustituida por un análogo de glutamina sin una pérdida sustancial de actividad en el receptor de glucagón, y en algunos casos, con una mejora de la actividad del receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el análogo de glutamina es un aminoácido de origen natural o de origen no natural o no codificado que comprende una cadena lateral de Estructura I, II o III:



Estructura I



Estructura II



Estructura III

en las que R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>0-3</sub> o heteroalquilo C<sub>0-3</sub>; R<sup>2</sup> es NHR<sup>4</sup> o alquilo C<sub>1-3</sub>; R<sup>3</sup> es alquilo C<sub>1-3</sub>; R<sup>4</sup> es H o alquilo C<sub>1-3</sub>; X es NH, O, o S; e Y es NHR<sup>4</sup>, SR<sup>3</sup> u OR<sup>3</sup>. En algunas realizaciones, X es NH o Y es NHR<sup>4</sup>. En algunas realizaciones, R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>0-2</sub> o heteroalquilo C<sub>1</sub>. En algunas realizaciones, R<sup>2</sup> es NHR<sup>4</sup> o alquilo C<sub>1</sub>. En algunas realizaciones, R<sup>4</sup> es H o alquilo C<sub>1</sub>. En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la estructura I en la que R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>-S, X es NH, y R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> (acetamidometilo-cisteína, C(Acm)); R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>, X es NH, y R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> (ácido acetildiaminobutanoico, Dab (Ac)); R<sup>1</sup> es alquilo C<sub>0</sub>, X es NH, R<sup>2</sup> es NHR<sup>4</sup>, y R<sup>4</sup> es H (ácido carbamoildiaminopropanoico, Dap (urea)); o R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>, X es NH, y R<sup>2</sup> es CH<sub>3</sub> (acetilornitina, Orn (Ac)). En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura II en la que, R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub>, Y es NHR<sup>4</sup>, y R<sup>4</sup> es CH<sub>3</sub> (metilglutamina, Q (Me)); en realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la estructura III en la que R<sup>1</sup> es CH<sub>2</sub> y R<sup>4</sup> es H (sulfóxido de metionina, M(O)); en realizaciones específicas, el aminoácido en la posición 3 está sustituido por Dab(Ac) Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 601 SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604, SEQ ID NO: 605, y SEQ ID NO: 606 de la lista de secuencias de la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/UTS2009/047.438, presentada el 16 de junio de 2009, en la que estas secuencias de aminoácidos están modificadas, tal como se describe adicionalmente en este documento, por ejemplo, modificadas para comprender al menos tres aminoácidos que inducen una hélice alfa, modificadas para comprender (i) un aminoácido acilado o alquilado en la posición 10, (ii) un aminoácido que induce una hélice alfa en la posición 16, (iii) un aminoácido alifático en la posición 17 y/o 18, y (iv) al menos un aminoácido cargado que se encuentra C-terminal a la posición 27, y, opcionalmente, otras modificaciones; modificadas para comprender al menos tres aminoácidos de los aminoácidos 18-24 de la exendina-4 (SEQ ID NO: 8) en las posiciones correspondientes del análogo de glucagón.

#### Modificación en la posición 7

[0149] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada con una modificación de aminoácido en la posición 7. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 7 de la SEQ ID NO: 1 (Thr) está sustituido por un aminoácido alifático grande, por ejemplo, Ile, Leu, Ala, y similares. Tales modificaciones se cree que reducen drásticamente la actividad en el receptor de GLP-1 del análogo de glucagón.

#### Modificación en la posición 15

[0150] En algunas realizaciones, los análogos de glucagón comprenden una SEQ ID NO: 1 modificada con una modificación de aminoácido en la posición 15 que mejora la estabilidad. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 15 de la SEQ ID NO: 1 se elimina o sustituye por ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. Tales modificaciones reducen la degradación o la escisión del análogo con el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos, por ejemplo, tampones a un pH dentro del intervalo de 5,5 a 8. En algunas realizaciones, los análogos de glucagón que comprenden esta modificación retienen al menos el 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% del análogo original después de 24 horas a 25°C.

#### Modificación en la posición 16

[0151] De acuerdo con una realización, se proporcionan análogos de glucagón que tienen una potencia mejorada y, opcionalmente, una solubilidad y estabilidad mejoradas. En una realización, la potencia mejorada de glucagón y GLP-1 es proporcionada por una modificación de aminoácido en la posición 16 del glucagón natural (SEQ ID NO: 1).

A modo de ejemplo no limitativo, dicha potencia mejorada se puede proporcionar mediante la sustitución de la serina natural en la posición 16 por ácido glutámico o por otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente por uno cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico, o un aminoácido cargado que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo, (por ejemplo, N, o, S, P) y con una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende un SEQ ID NO: 1 modificada que comprende una sustitución de la Ser en la posición 16 por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, treonina o glicina. En algunos aspectos, el residuo serina en la posición 16 se sustituye por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteico. En algunos aspectos específicos, el residuo serina en la posición 16 se sustituye por ácido glutámico o una sustitución conservadora del mismo (por ejemplo, un aminoácido de extendina-4).

[0152] En realizaciones alternativas, el análogo de glucagón comprende una secuencia modificada de la SEQ ID NO: 1 modificada por una sustitución de Ser en la posición 16 por Thr o AIB u otro aminoácido que induce una hélice alfa tal como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en  $j + 3$  o  $i + 4$ .

#### Modificación en las posiciones 17-18

[0153] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada en la que el sitio Arg-Arg dibásico en las posiciones 17 y 18 está eliminado. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la eliminación del sitio dibásico en algunas realizaciones mejora la eficacia in vivo del análogo de glucagón. En algunos aspectos, el análogo de glucagón se modifica en este sentido mediante la sustitución de uno o ambos de los aminoácidos en las posiciones 17 y 18 de la SEQ ID NO: 1 por un aminoácido que no es básico, por ejemplo, por un aminoácido alifático. En algunas realizaciones, uno de los aminoácidos en la posición 17 o 18 se suprime o se inserta un aminoácido entre las posiciones 17 y 18. En algunas realizaciones, la Arg en la posición 17 se sustituye por otro aminoácido, tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, Gln, un aminoácido que comprende un resto hidrófilo, un aminoácido que induce una hélice alfa. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce una hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en  $j + 3$  o  $i + 4$ . En algunas realizaciones, la Arg en la posición 18 se sustituye por otro aminoácido tal como se describe en el presente documento. En aspectos de ejemplo, el aminoácido en la posición 18 es un aminoácido alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 18 es un aminoácido alifático pequeño, por ejemplo, Ala. En algunos aspectos específicos, el aminoácido en la posición 18 es un aminoácido alifático pequeño, por ejemplo, Ala, y la Arg en la posición 17 no está modificada.

#### Modificación en la posición 20

[0154] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 también es proporcionada por una modificación de aminoácido en la posición 20. En algunas realizaciones, la glutamina en la posición 20 se sustituye por un aminoácido que induce una hélice alfa, por ejemplo AIB, tal como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce una hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en  $j-3$  o  $i-4$ . En algunas realizaciones específicas, el aminoácido es un aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o tiene una capacidad de enlace de hidrógeno, y tiene al menos aproximadamente 5 (o aproximadamente 4-6) átomos de longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina u ornitina, y forma opcionalmente un puente de sal con otro aminoácido que induce una hélice alfa en la posición 16, por ejemplo un aminoácido cargado negativamente. Tales modificaciones, en algunos aspectos particulares, reducen la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln y en algunas realizaciones, aumentan la actividad del análogo del glucagón en el receptor de GLP-1. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 20 es Glu o Lys o AIB.

#### Modificación en las posiciones 21, 23, 24 y 28

[0155] En algunas realizaciones, la posición 21 y/o la posición 24 está modificada por sustitución por un aminoácido que induce una hélice alfa. En algunas realizaciones, el aminoácido que induce la hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en  $j-3$  o  $i-4$ . En algunos aspectos, el aminoácido que induce una hélice alfa es AIB.

[0156] En realizaciones de ejemplo, el aminoácido en la posición 23 es una Ile.

[0157] En aspectos de ejemplo, el aminoácido en la posición 28 es un aminoácido alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, AIB.

#### Extremo C-terminal cargado

[0158] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón se modifica mediante sustituciones de aminoácidos y/o adiciones que introducen un aminoácido cargado en la parte C-terminal del análogo. En algunas realizaciones, tales

modificaciones mejoran la estabilidad y la solubilidad. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido cargado" o "residuo 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. En algunos aspectos, estas sustituciones y/o adiciones de aminoácidos que introducen modificaciones de un aminoácido cargado están en una posición C-terminal a la posición 27 de la SEQ ID NO: 1. En algunas realizaciones, uno, dos o tres (y en algunos casos, más de tres) aminoácidos cargados se introducen dentro de la parte C-terminal (por ejemplo, la posición o posiciones C-terminal a la posición 27). De acuerdo con algunas realizaciones, el aminoácido o aminoácidos naturales en las posiciones 28 y/o 29 están sustituidos por un aminoácido cargado, y/o en una realización adicional, también se añaden de uno a tres aminoácidos cargados al C-terminal del análogo. En realizaciones de ejemplo, uno, dos o todos los aminoácidos cargados son de carga negativa. El aminoácido cargado negativamente, en algunas realizaciones, es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico, o ácido homoglutámico. En algunos aspectos, estas modificaciones aumentan la solubilidad, por ejemplo, proporcionan al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o más solubilidad relativa al glucagón natural a un pH determinado entre aproximadamente 5,5 y 8, por ejemplo, pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C.

#### Truncamiento del extremo C-terminal

[0159] De acuerdo con algunas realizaciones, los análogos de glucagón descritos en este documento están modificados por el truncamiento del extremo C-terminal por uno o dos residuos de aminoácidos. Tales péptidos de glucagón modificados, tal como se muestran en el presente documento, retienen una actividad y potencia similares en el receptor de glucagón y el receptor de GLP-1. A este respecto, los péptidos de glucagón pueden comprender los aminoácidos 1-27 o 1-28 del análogo de glucagón natural (SEQ ID NO: 1), opcionalmente con cualquiera de las modificaciones adicionales que se describen en este documento.

#### Extremo C-terminal de carga neutra

[0160] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada en la que el ácido carboxílico del aminoácido C-terminal se sustituye por un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, tales modificaciones, en ciertos aspectos, aumentan la actividad del análogo del glucagón en el receptor de GLP-1. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el análogo de glucagón es un péptido amidado, de manera que el residuo C-terminal comprende una amida en lugar del alfa carboxilato de un aminoácido. Tal como se utiliza en el presente documento, una referencia general a un péptido o análogo pretende abarcar péptidos que tienen un extremo amino terminal, extremo carboxi terminal, o ambos extremos amino y carboxi terminal modificados. Por ejemplo, se pretende que una cadena de aminoácidos que compone un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal sea abarcado por una secuencia de aminoácidos que designa los aminoácidos estándar.

#### Otras modificaciones

[0161] En algunas realizaciones, los análogos de glucagón comprenden adicionalmente o alternativamente las siguientes modificaciones de aminoácidos:

- (i) sustitución de Ser en la posición 2 por Ala;
- (ii) sustitución de Tyr en la posición 10 por Val o Phe, o Trp;
- (iii) sustitución de Lys en la posición 12 por Arg;
- (iv) sustitución de Arg en la posición 17 por Gln o un aminoácido alifático pequeño, por ejemplo, Ala, o un aminoácido alifático grande, por ejemplo, Ile;
- (v) sustitución de Arg en la posición 18 por un aminoácido alifático pequeño, por ejemplo, Ala; o un aminoácido que contiene imidazol, por ejemplo, His;
- (vi) sustitución de Ala en la posición 19 or un aminoácido de carga positiva, por ejemplo, Gln;
- (vii) sustitución de Val en la posición 23 por Ile, y
- (viii) sustitución de Thr en la posición 29 por Gly o Gln.

[0162] En algunas realizaciones, la estabilidad del análogo de glucagón se incrementa por modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, por sustitución por leucina o norleucina. Tales modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa. La estabilidad también se puede aumentar mediante la modificación de Gln en la posición 20 o 24 o 28, por ejemplo, por sustitución por Ala, Ser, Thr, o Aib. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln. La estabilidad puede aumentarse mediante la modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, por sustitución por otro residuo ácido, por ejemplo, Glu. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclica seguido por isomerización a isoaspartato.

[0163] En algunas realizaciones, los análogos de glucagón descritos en este documento están glicosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados a través de, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertidos en una sal (por ejemplo, una sal de adición de ácido, una sal de adición de base), y/o opcionalmente dimerizados, multimerizados, o polimerizados, o conjugados.

[0164] Cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, las modificaciones que aumentan o disminuyen la actividad del receptor de glucagón y que aumentan la actividad del receptor DE GLP-1, pueden aplicarse individualmente o en combinación. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 pueden proporcionar mayor actividad de GLP-1 que cualquiera de tales modificaciones tomadas individualmente.

#### REALIZACIONES DE EJEMPLO

[0165] La presente descripción proporciona péptidos que comprenden una estructura similar a la de glucagón humana natural y que muestran actividad agonista mejorada en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón humano natural. El glucagón tiene normalmente aproximadamente el 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, mientras que el GLP-1 normalmente tiene menos de aproximadamente el 0,01% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón. Por consiguiente, los péptidos de la presente descripción muestran más del 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En realizaciones de ejemplo, los péptidos de la presente descripción muestran mayor que o aproximadamente 5%, mayor que o aproximadamente 10%, mayor que o aproximadamente el 15%, mayor que o aproximadamente el 20%, mayor que o aproximadamente 25%, mayor que o sobre 30%, mayor que o aproximadamente 35%, mayor que o aproximadamente 40%, mayor que o aproximadamente el 45%, mayor que o aproximadamente el 50%, mayor que o aproximadamente el 55%, mayor que o aproximadamente 60%, mayor que o aproximadamente 65 %, mayor que o aproximadamente el 70%, mayor que o aproximadamente el 75%, mayor que o aproximadamente 80%, mayor que o aproximadamente 85%, mayor que o aproximadamente 90%, o mayor que o aproximadamente 95% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En aspectos de ejemplo, los péptidos de la presente descripción muestran actividad en el receptor de GLP-1 que es mayor que la de GLP-1 natural. En consecuencia, en aspectos de ejemplo, los péptidos de la presente descripción muestran mayor que o aproximadamente 100% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En aspectos de ejemplo, los péptidos de la presente descripción muestran mayor que o aproximadamente el 150%, mayor que o aproximadamente el 200%, mayor que o aproximadamente el 250%, mayor que o aproximadamente el 300%, mayor que o aproximadamente el 350%, mayor que o aproximadamente el 400%, mayor que o aproximadamente el 450%, mayor que o aproximadamente el 500%, mayor que o aproximadamente el 550%, mayor que o aproximadamente el 600%, mayor que o aproximadamente el 650%, mayor que o aproximadamente el 700%, mayor que o aproximadamente el 750 %, mayor que o aproximadamente el 800%, mayor que o aproximadamente el 850%, mayor que o aproximadamente el 900%, mayor que o aproximadamente el 950%, o mayor que o aproximadamente el 1000% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

[0166] En realizaciones de ejemplo, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12.

[0167] En realizaciones de ejemplo, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.

[0168] En realizaciones de ejemplo, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14.

[0169] En realizaciones de ejemplo, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15.

[0170] En realizaciones de ejemplo, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y muestra una selectividad de al menos 100 veces para el ser receptor de GLP-1 humano frente al receptor de GIP.

[0171] En realizaciones de ejemplo, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

[0172] La presente descripción proporciona adicionalmente péptidos variantes que comprenden una secuencia de aminoácidos que es altamente similar a la secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos descritos en el presente documento. En realizaciones de ejemplo, el péptido variante de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los aminoácidos 1-29 de la secuencia de aminoácidos del péptido de cualquiera de las SEQ ID NOs: 12-17, en el que el péptido variante conserva la actividad del péptido parental en el receptor de GLP-1, receptor de glucagón, y el receptor de GIP (por ejemplo, muestra una selectividad de al menos 100 veces para el receptor de GLP-1 humano frente al receptor de GIP), y opcionalmente una potencia de GLP-1 de al menos 1%; o en el que la EC50 del péptido en el receptor de GIP es menos de 100 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP-1). En realizaciones de ejemplo, el péptido variante de la presente descripción muestra una selectividad al menos 100 veces mayor para el receptor de GLP-1 humano frente al receptor de GIP.

[0173] En realizaciones de ejemplo, el péptido variante de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos basada en una secuencia de aminoácidos de un péptido de la presente descripción, pero se diferencia en una o más posiciones de aminoácidos, incluyendo, pero no limitado a la posición 1, la posición 2, la posición 3, la posición 7, la posición 10, posición 12, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 20, posición 21, posición 23, posición 24, posición 27, posición 28, posición 29. En aspectos de ejemplo, el péptido variante puede comprender una sustitución conservadora con respecto al péptido parental, puede comprender cualquiera de las modificaciones de aminoácidos descritas en este documento, o puede comprender una modificación de aminoácidos

que vuelve al aminoácido presente en esa posición en la secuencia de glucagón natural (SEQ ID NO: 1). En aspectos de ejemplo, el péptido variante de la presente descripción comprende una secuencia de aminoácidos basada en una secuencia de aminoácidos de un péptido de la presente descripción, pero difiere en una o más de las siguientes maneras:

- 5 a) el péptido variante comprende un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado;
- b) un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado está sustituido por el correspondiente aminoácido del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en esa posición o una sustitución conservadora del aminoácido natural, y opcionalmente un nuevo aminoácido acilado o alquilado se introduce en una posición diferente;
- 10 c) el péptido variante comprende un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo;
- d) un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo está sustituido por el correspondiente aminoácido del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en esa posición, y opcionalmente un nuevo aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo se introduce en una posición diferente ;
- e) el aminoácido C-terminal del péptido variante comprende una amida C-terminal en lugar de un alfa carboxilato C-terminal;
- 15 f) un aminoácido en cualquiera de las posiciones 1 a 29 está sustituido por el correspondiente aminoácido del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en esa posición;
- g) o cualquiera de sus combinaciones.

[0174] Con respecto a cualquiera de los péptidos variantes anteriores, en realizaciones de ejemplo, el péptido variante comprende un resto hidrófilo unido covalentemente a un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de una extensión C-terminal o en el extremo C-terminal. En aspectos de ejemplo, el péptido variante comprende una Cys, Lys, Orn, homocisteína, y Ac-Phe unidos covalentemente a un resto hidrófilo, opcionalmente, en el que la Cys, Lys, Orn, homocisteína, o Ac-Phe se encuentran en la posición 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de una extensión C-terminal o en el extremo C-terminal del péptido variante. En aspectos de ejemplo, el resto hidrófilo es polietilenglicol.

[0175] En aspectos de ejemplo, el péptido variante comprende un aminoácido acilado o alquilado, opcionalmente, en la posición 10. En aspectos de ejemplo, el péptido variante comprende un aminoácido acilado o alquilado que comprende una cadena alquilo C8 a C20, una cadena de alquilo C12 a C18, o una cadena de alquilo C14 o C16. En aspectos de ejemplo, el péptido variante comprende un aminoácido acilado o alquilado que es un aminoácido acilado o alquilado de fórmula I, fórmula II, o fórmula III, opcionalmente, en el que el aminoácido de Fórmula I es Lys.

[0176] En aspectos de ejemplo, el péptido variante de la presente descripción comprende un aminoácido acilado o alquilado, en el que el grupo acilo o el grupo alquilo está unido covalentemente al aminoácido a través de un espaciador, opcionalmente, en el que el espaciador es un aminoácido o un dipéptido. En realizaciones de ejemplo, el espaciador comprende uno o dos restos ácidos.

[0177] En cualquiera de los ejemplos de realización anteriores, el péptido o péptido variante de cualquiera de las presentes divulgaciones muestra una (EC50 en el receptor de glucagón)/(EC50 en el receptor de GLP-1) que es de aproximadamente 20 o menos (por ejemplo, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,10, 0,05, 0,025, 0,01, 0,001).

[0178] En cualquiera de los ejemplos de realización anteriores, el péptido o péptido variante de cualquiera de las presentes divulgaciones muestra una (EC50 en el receptor de glucagón)/(EC50 en el receptor de GLP-1) que es más de 20 (por ejemplo, 21, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, o más).

[0179] En cualquiera de los ejemplos de realización anteriores, el péptido o péptido variante de cualquiera de las presentes divulgaciones presenta una EC50 en el receptor de GLP-1 que es de dos a diez veces (por ejemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veces) mayor que la EC50 en el receptor de glucagón.

#### EXCLUSIONES

[0180] En realizaciones de ejemplo, cualquiera de los siguientes péptidos se excluye de los análogos de glucagón descritos en este documento, aunque cualquiera de los siguientes péptidos que comprenden una o más modificaciones adicionales en los mismos descritas en el presente documento que muestran la actividad de GLP-1 o coagonista deseada, las composiciones farmacéuticas, los kits, y métodos de tratamiento utilizando tales compuestos se pueden incluir en la descripción: el péptido de SEQ ID NO: 1 con una sustitución [Arg12] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Arg12, Lys20] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Arg12, Lys24] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Arg12, Lys29] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con una sustitución [Glu9]; el péptido de SEQ ID NO: 1 al que le falta His1, con sustituciones [Glu16, Lys29, Glu9] y amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Glu16, Lys29, Glu9] y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Lys13, Glu17] unidas a través de puente de lactama y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 con sustituciones [Lys17, Glu21] unidas a través de puente de lactama y con una amida C-terminal; el péptido de SEQ ID NO: 1 al que le falta His1, con sustituciones [Glu20, Lys24] unidas a través de puente de lactama. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón no es cualquiera de los péptidos descritos en cualquiera

de Solicitud de Patente Internacional No. PCT/LTS2009/034.448, presentada el 19 de febrero de 2009, y publicada el 26 de agosto de 2010, como WO 2010/096052; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2009/068678, presentada el 18 de diciembre de 2009, y publicada el 26 de agosto de 2010, como WO 2010/096142; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2009/047438, presentada el 16 de junio de 2009, y publicada el 23 de diciembre de 2009 como WO 2009/155258; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2008/053857, presentada el 13 de febrero de 2008, y publicada el 21 de agosto de 2008, como WO 2008/101017; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2010/059724, presentada el 9 de diciembre, 2010; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2009/047447, presentada el 16 de junio de 2009, y publicada el 28 de enero de 2010, como WO2010/011439; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2010/38825, presentada el 16 de junio de 2010 y publicada el 23 de diciembre de 2010, como WO2010/148089; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2011/022608, presentada el 26 de enero de 2011; y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/426.285, presentada el 22 de diciembre de 2010. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón no incluye la totalidad o parte de la secuencia de KRNRNIA unida al extremo C-terminal después de la posición 29, por ejemplo KRNR.

#### PROCEDIMIENTOS DE FABRICACIÓN DE PÉPTIDOS

**[0181]** Los análogos de glucagón de la descripción se pueden obtener mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados de la síntesis de novo de péptidos se describen en, por ejemplo, Chan et al, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido., 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido., 2000; y la patente de Estados Unidos N° 5.449.752.

**[0182]** Además, en los casos en los que los análogos de la descripción no comprenden cualquiera de los aminoácidos no codificados o no naturales, el análogo del glucagón puede producirse de forma recombinante utilizando un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del análogo utilizando procedimientos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY., 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, Nueva York, 1994.

**[0183]** En algunas realizaciones, los análogos de glucagón de la descripción están aislados. En algunas realizaciones, los análogos de glucagón de la descripción están purificados. Se reconoce que la "pureza" es un término relativo, y no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta o enriquecimiento absoluto o selección absoluta. En algunos aspectos, la pureza es de al menos o aproximadamente el 50%, de al menos o aproximadamente el 60%, de al menos o aproximadamente el 70%, de al menos o aproximadamente el 80%, de al menos o aproximadamente el 90% (por ejemplo, de al menos o aproximadamente el 91%, de al menos o aproximadamente el 92%, de al menos o aproximadamente el 93%, de al menos o aproximadamente el 94%, de al menos o aproximadamente el 95%, de al menos o aproximadamente el 96%, de al menos o aproximadamente el 97%, de al menos o aproximadamente el 98 %, de al menos o aproximadamente el 99% o es de aproximadamente el 100%.

**[0184]** En algunas realizaciones, los péptidos descritos en el presente documento se sintetizan comercialmente por empresas, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los péptidos pueden ser sintéticos, recombinante, aislados, y/o purificados.

#### CONJUGADOS

**[0185]** La descripción proporciona además conjugados que comprenden uno o más de los análogos de glucagón descritos en el presente documento conjugados a un grupo heterólogo, en el que el conjugado muestra una mayor actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural, y muestra una selectividad de al menos 100 veces por el receptor de GLP-1 humano frente al receptor de GIP. Tal como se utiliza en este documento, el término "grupo heterólogo" es sinónimo del término "grupo conjugado" y se refiere a cualquier molécula (química o bioquímica, de origen natural o no codificado) que es diferente de los análogos de glucagón descritos en el presente documento. Los grupos conjugados de ejemplo que se pueden unir a cualquiera de los análogos descritos en este documento incluyen, pero no se limitan a, un péptido o polipéptido heterólogo (incluyendo, por ejemplo, una proteína de plasma), un agente de reconocimiento, una inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o la región Fc), una etiqueta de diagnóstico, tal como una etiqueta de radioisótopo, fluoróforo o enzimática, un polímero que incluye polímeros solubles en agua, u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En algunas realizaciones, se proporciona un conjugado que comprende un análogo de la presente descripción y una proteína de plasma, en el que la proteína de plasma se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas. En algunas realizaciones, el grupo de proteína de plasma del conjugado es albúmina o transferrina. El conjugado, en algunas realizaciones, comprende uno o más de los análogos de glucagón descritos en este documento y uno o más de: un péptido (que es distinto de los análogos de glucagón activos del receptor de glucagón y/o GLP-1 descritos en el presente documento), un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o fragmento del mismo, un polímero, un punto cuántico, una molécula pequeña, una toxina, un agente de diagnóstico,

un carbohidrato, un aminoácido.

**[0186]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es un péptido que es distinto de los análogos activos de receptor de glucagón y/o GLP-1 descritos en este documento y el conjugado es un péptido de fusión o un péptido quimérico. En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es una extensión de péptido de 1-21 aminoácidos. En realizaciones específicas, la extensión se une al C-terminal del análogo de glucagón, por ejemplo, al aminoácido en la posición 29.

**[0187]** En algunos aspectos específicos, la extensión es un único aminoácido o dipéptido. En realizaciones específicas, la extensión comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: un aminoácido cargado (por ejemplo, un aminoácido con carga negativa (por ejemplo, Glu), un aminoácido con carga positiva), un aminoácido que comprende un grupo hidrófilo. En algunos aspectos, la extensión es Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu.

**[0188]** En algunas realizaciones, la extensión comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 10 (GGPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 11 (KRNRNNIA), o SEQ ID NO: 12 (KRNR). En aspectos específicos, la secuencia de aminoácidos está unida a través del aminoácido C-terminal del análogo de glucagón, por ejemplo, el aminoácido en posición 29. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 13-16 está unida al aminoácido 29 del análogo de glucagón a través de un enlace peptídico. En algunas realizaciones específicas, el aminoácido en la posición 29 del análogo de glucagón es una Gly y la Gly se fusiona a una de las secuencias de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOS: 8-11.

**[0189]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es un polímero. En algunas realizaciones, el polímero se selecciona del grupo que consiste en: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos, incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros vinílicos, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo), y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo alquilcelulosa, hidroxialquil celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, y sal sódica de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno) y poli (tereftalato de etileno), y poliestireno.

**[0190]** En algunos aspectos, el polímero es un polímero biodegradable, incluyendo un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli (ácido valérico), y poli(láctido-cocaprolactona)), y un polímero natural biodegradable (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos, incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones realizadas rutinariamente por los expertos en la materia), albúmina y otras proteínas hidrófilas (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan mediante hidrólisis enzimática o la exposición al agua in vivo, por erosión superficial o en masa.

**[0191]** En algunos aspectos, el polímero es un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por H.S. Sawhney, C. P. Pathak y J.A. Hubbell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

**[0192]** En algunas realizaciones, el polímero es un polímero soluble en agua o un polímero hidrófilo. Los polímeros hidrófilos se describen adicionalmente en este documento bajo el título "Grupos hidrófilos". Los polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil butilcelulosa, hidroxipropil pentilcelulosa, metil celulosa, etil celulosa (Ethocel), hidroxietil celulosa, diversas alquil celulosas e hidroxialquil celulosas, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, copolímeros de acetato de vinilo/ácido crotonico, metacrilato de poli-hidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido metacrílico, polimetacrilato de metilo, copolímeros de anhídrido maleico/metil vinil éter, poli vinilalcohol, ácido poliacrílico sódico y cálcico, ácido poliacrílico, carboxi polímeros ácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxi-etileno y polioxi-propileno, anhídrido de polimetilviniléter co-maleico, carboximetilamida, co-polímero de metacrilato de potasio y divinilbenceno, polioxi-etilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

**[0193]** En realizaciones específicas, el polímero es un polialquilenglicol, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

**[0194]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, el hidrato de carbono es un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano).

**[0195]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es un lípido. El lípido, en algunas realizaciones, es un ácido graso, eicosanoide, prostaglandina, leucotrienos, tromboxano, N-acil etanolamina), glicerolípido (por ejemplo, mono, gliceroles mono-, di-, trisustituídos), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ejemplo, esfingosina, ceramida), lípido esteroide (por ejemplo, esteroide, colesterol), lípido prenol, sacarolípido, o un policétido, aceite, cera, colesterol, esteroide, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

**[0196]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo está unido mediante enlace no covalente o covalente al análogo de la presente descripción. En aspectos de ejemplo, el grupo heterólogo está unido al análogo de la presente descripción a través de un enlazador. La unión puede llevarse a cabo por enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas, tales interacciones electrostáticas, puentes de hidrógeno, iónicas, de van der Waals, o interacciones hidrófobas o hidrófilas. Se pueden utilizar una variedad de sistemas de acoplamiento no covalentes, incluyendo biotina-avidina, ligando/receptor, enzima/sustrato, ácido nucleico/proteína de unión a ácido nucleico, lípido/proteína de unión a lípido, complementos de la molécula de adhesión celular; o cualquier complemento de unión o fragmentos de los mismos que tengan afinidad entre sí.

**[0197]** El análogo de glucagón, en algunas realizaciones, está unido a grupos de conjugación a través de unión covalente directa mediante la reacción de los residuos de aminoácidos diana del análogo con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos de los extremos N o C-terminales de estos aminoácidos diana. Los grupos reactivos en el péptido o conjugado incluyen, por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol,  $\alpha$ -haloacetilo, maleimido o hidrazino. Los agentes de derivatización incluyen, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica. Alternativamente, los grupos conjugados se pueden unir al análogo indirectamente a través de portadores intermedios, tales como polisacáridos o polipéptidos portadores. Ejemplos de portadores de polisacáridos incluyen aminodextrano. Ejemplos de portadores de polipéptidos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglútamico, ácido poliaspártico, copolímeros de los mismos, y los polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para conferir propiedades de solubilidad deseables en el portador cargado resultante.

**[0198]** Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más habitualmente con  $\alpha$ -haloacetatos (y las correspondientes aminas), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para producir derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo- $\beta$ -(5-imidazolil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

**[0199]** Los residuos de histidilo se derivan mediante la reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

**[0200]** Los residuos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobenzenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

**[0201]** Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al elevado  $pK_a$  del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo épsilon-amino de arginina.

**[0202]** La modificación específica de los residuos de tirosilo se puede realizar, con especial interés en la introducción de marcadores espectrales en los residuos tirosilo, mediante la reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más habitualmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

**[0203]** Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante la reacción con carbodiimidias ( $R-N=C=N-R'$ ), en las que R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4 etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

**[0204]** Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina, e histidina (T.E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pág. 79-86 (1983)), la desamidación de glutamina o asparagina, la acetilación de la amina N-terminal, y/o la amidación o esterificación del grupo ácido carboxílico C-terminal.

**[0205]** Otro tipo de modificación covalente implica el acoplamiento químico o enzimático de glicósidos al antagonista. Se puede unir un azúcar o azúcares a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos métodos se describen en el documento WO87/05330 publicado 11 de septiembre 1987, y en Aplin y Wriston, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, pág. 259-306 (1981).

**[0206]** En algunas realizaciones, el análogo de glucagón se conjuga a un grupo heterólogo a través de un enlace covalente entre una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón y el grupo heterólogo. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón se conjuga a un grupo heterólogo a través de la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, o 29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal o una combinación de estas posiciones. En algunos aspectos, el aminoácido unido covalentemente a un grupo heterólogo (por ejemplo, el aminoácido que comprende un grupo heterólogo) es una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un grupo heterólogo.

**[0207]** En algunas realizaciones, el conjugado comprende un enlazador que une el análogo de glucagón al grupo heterólogo. En algunos aspectos, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o de 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, de 2 a 10 átomos, de 5 a 10 átomos, o de 10 a 20 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena en la cadena principal del enlazador se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N, y S. Los átomos de la cadena y los enlazadores se pueden seleccionar según su solubilidad (hidrofilicidad) esperada a fin de proporcionar un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que está sujeto a la escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas que se encuentran en el tejido u órgano o célula dianas. En algunas realizaciones, la longitud del enlazador es lo suficiente larga para reducir el potencial impedimento estérico. Si el enlazador es un enlace covalente o un enlace peptídico y el conjugado es un polipéptido, todo el conjugado puede ser una proteína de fusión. Dichos enlazadores peptídico pueden tener cualquier longitud. Los enlazadores de ejemplo tienen de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos de longitud, de 5 a 50, de 3 a 5, de 5 a 10, de 5 a 15, o de 10 a 30 aminoácidos de longitud. Dichas proteínas de fusión pueden producirse, alternativamente, mediante métodos de ingeniería genética recombinante conocidos para un experto en la materia.

#### Conjugados: fusiones de Fc

**[0208]** Tal como se indicó anteriormente, en algunas realizaciones, los análogos se conjugan, por ejemplo, se fusionan a una inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o región Fc). Los tipos conocidos de inmunoglobulinas (Ig) incluyen IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. La región Fc es una región C-terminal de una cadena pesada de Ig, que es responsable de la unión a los receptores Fc que llevan a cabo actividades, tales como el reciclaje (que da lugar a una vida media prolongada), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC), y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

**[0209]** Por ejemplo, según algunas definiciones, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde la Cys226 al extremo C-terminal de la cadena pesada. La "región bisagra" generalmente se extiende desde Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 mediante la alineación de las cisteínas implicadas en la unión a cisteína). La región Fc de una IgG incluye dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 341. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende entre los aminoácidos 342 a 447. Las referencias a la numeración de amino ácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, o regiones, se basan todas en Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud Pública, Bethesda, MD. En realizaciones relacionadas, la región Fc puede comprender una o más regiones constantes modificadas o naturales de una cadena pesada de inmunoglobulina, diferente de CH1, por ejemplo, las regiones CH2 y CH3 de IgG e IgA, o las regiones CH3 y CH4 de IgE.

**[0210]** Los grupos de conjugado adecuados incluyen partes de secuencia de inmunoglobulina que incluyen el sitio de unión a FcRn. El FcRn, un receptor de salvamento, es responsable del reciclaje de inmunoglobulinas y su retorno

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

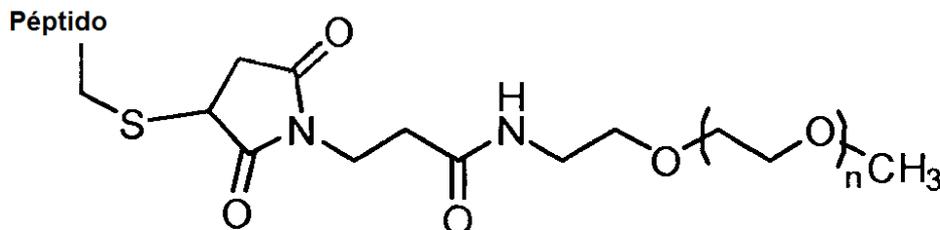
[0211] Algunos grupos de conjugado pueden incluir o no un sitio o sitios de unión a FcγR. FcγR son responsables de ADCC y CDC. Los ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra inferior), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E), y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G) (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000). La región bisagra inferior de IgE también se ha implicado en la unión a FcRI (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568 a 15578, 1997). Los residuos implicados en la unión al receptor de IgA se describen en Lewis et al., (J Immunol. 175: 6694-701, 2005). Los residuos de aminoácidos implicados en la unión al receptor de IgE se describen en Sayers et al. (J Biol Chem. 279 (34): 35320-5, 2004).

[0212] Las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse en la región Fc de una inmunoglobulina. Dichas regiones Fc variantes comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH3 de la región Fc (residuos 342-447) y/o al menos una modificación de aminoácido en el dominio CH2 de la región Fc (residuos 231-341). Las mutaciones que se cree que transmiten una mayor afinidad por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591). Otras mutaciones pueden reducir la unión de la región Fc a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y/o FcγRIIIA sin reducir significativamente la afinidad por FcRn. Por ejemplo, la sustitución de Asn en la posición 297 de la región Fc por Ala u otro aminoácido elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado y puede dar lugar a una inmunogenicidad reducida con una vida media prolongada concomitante de la región Fc, así como una unión reducida a FcγRs (Routledge et al 1995, Transplantation 60: 847; Friend et al 1999, Transplantation 68: 1632; Shields y otros, 1995, J. Biol. Chem. 276: 6591). Se han realizado modificaciones de aminoácidos en las posiciones 233-236 de IgG1 han sido hechos que reducen la unión a FcγRs (Ward y Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 y Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29: 2613). Algunas sustituciones de aminoácidos de ejemplo se describen en las Patentes de Estados Unidos 7.355.008 y 7.381.408.

#### Conjugados: restos hidrófilos

[0213] Los análogos de glucagón descritos en este documento pueden modificarse adicionalmente para mejorar su solubilidad y estabilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras conservan la actividad biológica elevada en relación con el glucagón natural. Los grupos hidrófilos, tales como PEG, se pueden unir a los análogos bajo cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Se pueden usar cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo a través de acilación, alquilación reductora, adición de Michael, alquilación con tiol u otros métodos de conjugación/unión quimioselectiva a través de un grupo reactivo sobre el grupo PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α-haloacetilo, maleimido o hidrazino) a un grupo reactivo en el compuesto diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α-haloacetilo, maleimido o hidrazino). Los grupos activadores que pueden utilizarse para enlazar el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen, sin limitación sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano, 5-piridilo y grupo acilo alfa-halogenado (por ejemplo, ácido alfa-yodo acético, ácido alfa-bromo acético, ácido alfa-cloro acético). Si se une al análogo mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un único aldehído reactivo, de manera que se controla el grado de polimerización. Véase, por ejemplo, Kinstler et al., Adv. Drugs. Delivery Rev. 54: 477-485 (2002); Roberts et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 459-476 (2002); y Zalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182 (1995).

[0214] En aspectos específicos, un residuo de aminoácido del análogo que tiene un tiol se modifica con un grupo hidrófilo, tal como PEG. En algunas realizaciones, el tiol se modifica con PEG activado con maleimida en una reacción de adición de Michael para dar lugar a un análogo PEGilado que comprende el enlace de tioéter que se muestra a continuación:

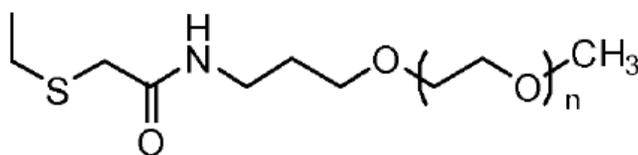


[0215] En algunas realizaciones, el tiol se modifica con un PEG activado con haloacetilo en una reacción de sustitución nucleófila para dar lugar a un análogo PEGilado que comprende un enlace tioéter.

5

Péptido

10



15 [0216] Los grupos hidrófilos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioles polioxiethylados (por ejemplo, POG), sorbitol polioxiethylado, glucosa polioxiethylada, glicerol polioxiethylado (POG), polioxiálquilenos, propionaldehído con polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, mono (C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliactetales, alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, poli- 1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli ( $\beta$ -aminoácidos) (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, ácidos colónicos u otros polímeros de polisacáridos, Ficoll u mezclas de los mismos. Los dextranos son polímeros de polisacáridos de subunidades de glucosa, predominantemente unidas por uniones  $\alpha$ 1-6. El dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, por ejemplo, de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 100 kD, o de aproximadamente 5, 10, 15 ó 20 kD a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ó 90 kD. Se contemplan polímeros lineales o ramificados. Las preparaciones resultantes de conjugados pueden ser esencialmente monodispersas o polidispersas, y pueden tener aproximadamente 0,5, 0,7, 1, 1,2, 1,5 ó 2 grupos de polímeros por análogo.

30 [0217] En algunas realizaciones, el análogo de glucagón se conjuga a un grupo hidrófilo a través de enlace covalente entre una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón y el grupo hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón se conjuga a un grupo hidrófilo a través de la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, o 29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o en el aminoácido C-terminal, o una combinación de estas posiciones. En algunos aspectos, el aminoácido unido covalentemente a un grupo hidrófilo (por ejemplo, el aminoácido que comprende un grupo hidrófilo) es una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está covalentemente unido a un grupo hidrófilo (por ejemplo, PEG).

#### Conjugados: rPEG

40 [0218] En algunas realizaciones, el conjugado de la presente descripción comprende el análogo que tiene actividad agonista de glucagón y/o GLP-1 fusionado a un análogo accesorio que es capaz de formar una conformación extendida similar al PEG químico (por ejemplo, una molécula PEG recombinante (rPEG)), tales como los descritos en la publicación de solicitud de Patente Internacional No. WO2009/023270 y la publicación de la solicitud de Patente de Estados Unidos N° US20080286808. La molécula de rPEG en algunos aspectos es un polipéptido que comprende una o más de glicina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina o prolina. En algunos aspectos, el rPEG es un homopolímero, por ejemplo, poli-glicina, poli-serina, poli-ácido glutámico, poli-ácido aspártico, poli-alanina, o poli-prolina. En otras realizaciones, el rPEG comprende dos tipos de aminoácidos repetidos, por ejemplo, poli (Gly-Ser), poli (Gly-Glu), poli (Gly-Ala), poli (Gly-Asp), poli (Gly-Pro), poli (Ser-Glu), etc. En algunos aspectos, el rPEG comprende tres tipos diferentes de aminoácidos, por ejemplo, poli (Gly-Ser-Glu). En aspectos específicos, el rPEG aumenta la vida media del análogo agonista de glucagón y/o GLP-1. En algunos aspectos, el rPEG comprende una carga positiva neta o carga negativa neta. El rPEG en algunos aspectos carece de estructura secundaria. En algunas realizaciones, el rPEG es mayor que o igual a 10 aminoácidos de longitud y en algunas realizaciones es de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. El péptido accesorio en algunos aspectos se fusiona con el extremo N- o C-terminal del análogo de la presente descripción a través de un enlace peptídico o un sitio de escisión por proteinasa, o se inserta en los bucles del análogo de la presente descripción. El rPEG en algunos aspectos comprende una etiqueta de afinidad o está unido a un PEG que es mayor que 5 kDa. En algunas realizaciones, el rPEG confiere al análogo de la presente descripción un mayor radio hidrodinámico, mayor vida media en suero, mayor resistencia a la proteasa, o mayor solubilidad y, en algunos aspectos, confiere el análogo una menor inmunogenicidad.

60

#### Conjugados: multímero

[0219] La descripción proporciona además multímeros o dímeros de los análogos descritos en este documento, incluyendo homomultímeros o heteromultímeros u homodímeros o heterodímeros. Dos o más de los análogos se pueden unir utilizando agentes de unión estándar y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los dímeros se pueden formar entre dos péptidos mediante el uso de agentes de reticulación bifuncionales

65

tiol y agentes de reticulación de amina bi-funcionales, en particular para los análogos que se han substituido con residuos de cisteína, lisina ornitina, homocisteína o acetil fenilalanina. El dímero puede ser un homodímero o, alternativamente, puede ser un heterodímero. En realizaciones de ejemplo, el enlazador que conecta los dos (o más) análogos es PEG, por ejemplo, un PEG de 5 kDa, un PEG de 20 kDa. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlace disulfuro. Por ejemplo, cada monómero del dímero puede comprender un residuo de Cys (por ejemplo, una Cys terminal o situada internamente) y el átomo de azufre de cada residuo de Cys participa en la formación del enlace disulfuro. En algunos aspectos, los monómeros están conectados a través de aminoácidos terminales (por ejemplo, N-terminal o C-terminal), a través de aminoácidos internos, o a través de un aminoácido terminal de al menos un monómero y un aminoácido interno de al menos otro monómero. En aspectos específicos, los monómeros no están conectados a través de un aminoácido N-terminal. En algunos aspectos, los monómeros del multímero se unen en una orientación "cola con cola" en la que los aminoácidos C-terminales de cada monómero se unen.

### COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, USOS Y KITS

#### Sales

**[0220]** En algunas realizaciones, el análogo de glucagón está en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en este 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. Dichas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y purificación del análogo, o se pueden preparar por separado mediante reacción de una función de base libre con un ácido adecuado. Muchos de los compuestos descritos en este documento son capaces de formar sales ácidas y/o básicas según la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

**[0221]** Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales de adición de ácido representativas incluyen, pero no se limitan a, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, bisulfato de sodio, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico, y similares. Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición farmacéuticamente ácidos aceptables incluyen, por ejemplo, un ácido inorgánico, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico, y un ácido orgánico, por ejemplo, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

**[0222]** Las sales de adición de base también se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación de la fuente de ácido salicílico, o haciendo reaccionar un grupo que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco o una amina orgánica primaria, secundaria, o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares, y amoníaco cuaternario no tóxico y cationes de amina incluyendo amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, trietilamonio, dietilamonio, y etilamonio, entre otros. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina, y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

**[0223]** Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno se pueden cuaternizar con el análogo de la presente descripción como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De esta manera, se obtienen productos solubles en agua o solubles en aceite o dispersables.

#### Formulaciones

**[0224]** Según algunas realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica en la que la composición comprende un análogo de glucagón de la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender cualquier ingrediente farmacéuticamente aceptable, incluyendo, por ejemplo, agentes acidificantes, aditivos, adsorbentes, propelentes de aerosoles, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalinizantes, agentes antiapelmazantes, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes de tamponamiento, agentes

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, desecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, disgregantes, dispersantes, agentes potenciadores de disolución, colorantes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de emulsión, cargas, agentes formadores de película, potenciadores del sabor, agentes aromatizantes, potenciadores de flujo, agentes gelificantes, agentes de granulación, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de pomadas, ungüentos, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases de pastilla, pigmentos, plastificantes, agentes de pulido, conservantes, agentes secuestrantes, agentes de penetración de la piel, agentes solubilizantes, disolventes, agentes estabilizantes, bases de supositorios, agentes activos de superficie, agentes tensoactivos, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes que incrementan la viscosidad, agentes que absorben agua, codisolventes miscibles en agua, ablandadores de agua, o agentes humectantes.

[0225] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno cualquiera o una combinación de los siguientes componentes: acacia, acesulfamo de potasio, citrato de acetiltributilo, citrato de acetiltriethyl, agar, albúmina, alcohol, alcohol deshidratado, alcohol desnaturado, diluir alcohol, ácido aleurítico, ácido algínico, poliésteres alifáticos, alúmina, hidróxido de aluminio, estearato de aluminio, amilopectina, alfa-amilosa, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, el aspartamo, agua bacteriostática para inyección, bentonita, magma de bentonita, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, bronopol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butilparabeno, sodio butilparabeno, alginato de calcio, ascorbato de calcio, carbonato de calcio, ciclamato de calcio, fosfato de calcio dibásico anhidro, fosfato de calcio dihidrato dibásico, fosfato de calcio tribásico, propionato de calcio, silicato de calcio, sorbato de calcio, estearato de calcio, sulfato de calcio, sulfato de calcio hemihidrato, aceite de canola, carbómero, dióxido de carbono, calcio carboximetil celulosa, sodio carboximetil celulosa, beta-caroteno, carragenano, aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado, cera emulsionante catiónico, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, celulosa microcristalina silicificada, la celulosa carboximetil de sodio, alcohol cetosteárico, cetrimida, alcohol cetílico, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, colesterol, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, hidrocloreto de clorhexidina, clorodifluoroetano (HCFC), clorodifluorometano, los clorofluorocarbonos (CFC) chlorophenoxyethanol, cloroxilenol, sólidos de jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro, monohidrato de ácido cítrico, manteca de cacao, agentes colorantes, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmelosa sódica, crospovidona, ácido ciclámico, ciclodextrinas, dextratos, dextrina, dextrosa, dextrosa anhidra, diazolidinilurea, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, dietanolamina, ftalato de dietilo, difluoroetano (HFC), dimetil-beta-ciclodextrina, compuestos de tipo ciclodextrina tales como Captisol (marca registrada), éter de dimetilo, ftalato de dimetilo, edetato de dipotasio, edetato de disodio, hidrógeno fosfato de disodio, docusato calcio, docusato potasio, docusato de sodio, galato de dodecilo, bromuro de dodeciltrimetilamonio, edetato de calcio edetato, ácido edtic, eglumine, alcohol etílico, etilcelulosa, galato de etilo, acetato de laurato, maltol etilo, oleato de etilo, etilparabeno, potasio etilparabeno, sodio etilparabeno, etil vainillina, fructosa, líquido de fructosa, fructosa muelle, fructosa libre de pirógenos, fructosa en polvo, ácido fumárico, gelatina, glucosa, glucosa líquida, mezclas de glicéridos de vegetales saturados ácidos grasos, glicerina, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, autoemulsionante monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, glicina, glicoles, glicofurol, goma guar, heptafluoropropano (HFC), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, jarabe de alta fructosa, albúmina de suero humano, hidrocarburos (HC), ácido clorhídrico diluido, aceite vegetal hidrogenado, tipo II, hidroxietil celulosa, hidroxietil-2-beta-ciclodextrina, hidroxipropil celulosa, celulosa de baja sustitución hidroxipropilo, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, imidurea, índigo carmín, intercambiadores de iones, óxidos de hierro, alcohol de isopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, solución salina isotónica, caolín, ácido láctico, lactitol, lactosa, lanolina, alcoholes de lanolina, lanolina anhidra, lecitina, silicato de aluminio de magnesio, carbonato de magnesio, magnesio normales carbonato, anhidro carbonato de magnesio, hidróxido de carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, lauril sulfato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, trisilicato de magnesio anhidro, ácido málico, malta, maltitol, la solución de maltitol, maltodextrina, maltol, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, meglumina, mentol, metilcelulosa, metacrilato de metilo, oleato de metilo, metilparabeno, el metilparabeno de potasio, metilparabeno de sodio, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica, aceite mineral, aceite mineral ligero, alcoholes de aceite mineral y lanolina, aceite, aceite de oliva, monoetanolamina, montmorillonita, galato de octilo, ácido oleico, ácido palmítico, parafina, aceite de cacahuete, vaselina, vaselina y alcoholes de lanolina, esmalte farmacéutico, fenol, fenol licuado, fenoxietanol, fenoxipropanol, alcohol feniletílico, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, polacrilina, polacrilina de potasio, poloxámero, povidona, polietilenglicol, óxido de polietileno, poliácridatos, polímeros de polietileno-polioxiopropileno de bloques, polimetacrilatos, éteres de alquilo de polioxi-etileno, derivados de aceite de ricino de polioxi-etileno, ésteres de ácido graso sorbitol de polioxi-etileno, estearatos de polioxi-etileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, alginato de potasio, benzoato de potasio, bicarbonato de potasio, bisulfito de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, citrato de potasio anhidro, hidrógeno fosfato de potasio, metabisulfito de potasio, fosfato de potasio monobásico, propionato de potasio, sorbato de potasio, povidona, propanol, ácido propiónico, carbonato de propileno, glicol de propileno, alginato de propilenglicol, galato de propilo, propilparabeno, potasio propilparabeno, coloidal de sodio propilparabeno, sulfato de protamina, aceite de colza, solución de Ringer, sacarina, sacarina de amonio, sacarina de calcio, sacarina de sodio, aceite de cártamo, saponita, proteínas de suero, aceite de sésamo, sílice coloidal, dióxido de silicio, alginato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bicarbonato de sodio, bisulfito de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio anhidro, dihidrato de citrato de sodio, cloruro de sodio, ciclamato de sodio, edetato de sodio, dodecil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sodio fosfato

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

**[0226]** En algunas realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, al menos A, en donde A es 0,0001% p/v, 0,001% p/v, 0,01 % p/v, 0,1% p/v, 1% p/v, 2% p/v, 5% p/v, 10% p/v, 20% p/v, 30% p/v, 40% p/v, 50% p/v, 60% p/v, 70% p/v, 80% p/v, o 90% p/v. En algunas realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, como máximo B, donde B es 90% p/v, 80% p/v, 70% p/v, 60% p/v, 50% p/v, 40% p/v, 30% p/v, 20% p/v, 10% p/v, 5% p/v, 2% p/v, 1% p/v, 0,1% p/v, 0,001% p/v, o 0,0001%. En otras realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier intervalo de concentración, tal como, por ejemplo, de aproximadamente A a aproximadamente B. En algunas realizaciones, A es 0,0001% y B es 90%.

**[0227]** Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para lograr un pH fisiológicamente compatible. En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica puede ser de al menos 5, al menos 5,5, al menos 6, al menos 6,5, al menos 7, al menos 7,5, al menos 8, al menos 8,5, al menos 9, al menos 9,5, al menos 10, o al menos 10,5 hasta e incluyendo pH 11, dependiendo de la formulación y la vía de administración. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes de tamponamiento para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. Los agentes tampón pueden incluir cualquier compuesto capaz de tamponamiento al pH deseado, tal como, por ejemplo, tampones de fosfato (por ejemplo, PBS), trietanolamina, tris, Bicina, TAPS, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES, u otros. En ciertas realizaciones, la fuerza del tampón es de al menos 0,5 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 30 mM, al menos 40 mM, al menos 50 mM, al menos 60 mM, al menos 70 mM, al menos 80 mM, al menos 90 mM, al menos 100 mM, al menos 120 mM, al menos 150 mM, o al menos 200 mM. En algunas realizaciones, la fuerza del tampón es no más de 300 mM (por ejemplo, como máximo 200 mM, como máximo 100 mM, como máximo 90 mM, como máximo 80 mM, como máximo 70 mM, como máximo 60 mM, como máximo 50 mM, como máximo 40 mM, como máximo 30 mM, como máximo 20 mM, como máximo 10 mM, como máximo 5 mM, como máximo 1 mM).

#### Vías de administración

**[0228]** La siguiente discusión sobre vías de administración se proporciona simplemente para ilustrar realizaciones de ejemplo y no debe interpretarse de ninguna manera como limitantes del alcance.

**[0229]** Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del análogo de la presente descripción disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina, o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas, y trociscos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, y los alcoholes de polietileno, ya sea con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina de cubierta dura o blanda ordinaria que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastillas pueden comprender el análogo de la presente descripción en un sabor, habitualmente

sacarosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el análogo de la presente descripción en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, emulsiones, geles, y similares que contienen, además, excipientes tal como son conocidos en la técnica.

5 **[0230]** Los análogos de la descripción, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden liberar a través de la administración pulmonar y se pueden disponer en formulaciones en aerosol para ser administrado vía inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o un atomizador. Dichas formulaciones de aerosol se pueden usar también para rociar la mucosa. En algunas realizaciones, el análogo se formula en una mezcla en polvo o en micropartículas o nanopartículas. Las formulaciones pulmonares adecuadas son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Qian et al, *Int J Pharm* 366: 218-220 (2009); Adjei y Garren, *Pharmaceutical Research*, 7 (6): 565-569 (1990); Kawashima et al, *J Controlled Release* 62 (1-2): 279-287 (1999); Liu et al, *Pharm Res* 10 (2): 228-232 (1993); Publicaciones de la solicitud de Patente Internacional Nos. WO 2007/133747 y WO 10 2007/141411.

20 **[0231]** Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones isotónicas estériles de inyección, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas al que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra vía tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa. El análogo de la presente descripción se puede administrar con un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol o alcohol de hexadecilo, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales, tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácido graso o glicéridos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tales como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

35 **[0232]** Los aceites, que se pueden utilizar en formulaciones parenterales incluyen de petróleo aceites animales, vegetales, o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen de cacahuate, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina, y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

40 **[0233]** Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metal alcalino, amonio, y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos, tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo, y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos, tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros, tales como, por ejemplo, alquil- $\beta$ -aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquilimidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

45 **[0234]** Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo conocido en la técnica.

50 **[0235]** Las formulaciones inyectables están de acuerdo con la descripción. Los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982) y el *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

60 **[0236]** Además, el análogo de la presente descripción se puede disponer en supositorios para la administración rectal mediante la mezcla con una variedad de bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, o fórmulas de pulverización que contienen, además del principio activo, portadores tales como se conocen en la técnica como apropiados.

65 **[0237]** Se entenderá por un experto en la técnica que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, el análogo de la descripción se puede formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas.

Dosis

**[0238]** Los análogos de la descripción se cree que son útiles en procedimientos de tratamiento de una enfermedad o afección médica en la que el agonismo del receptor de glucagón, agonismo del receptor de GLP-1, o coagonismo del receptor de glucagón/receptor de GLP-1 juegan un papel. Para los fines de la descripción, la cantidad o dosis del análogo de la presente descripción administrada debe ser suficiente para efectuar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un intervalo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del análogo de la presente descripción debe ser suficiente para estimular la secreción de AMPc de células tal como se describen en el presente documento o suficiente para disminuir los niveles de glucosa en sangre, los niveles de grasa, los niveles de ingesta de alimentos, o el peso corporal de un mamífero, en un período de de aproximadamente 1 a 4 minutos, de 1 a 4 horas o 1 a 4 semanas o más largo, por ejemplo, de 5 a 20 o más semanas, desde el momento de la administración. En ciertas realizaciones, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis se determinará por la eficacia del análogo particular de la presente descripción y la afección del animal (por ejemplo, humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, humano) a tratar.

**[0239]** En la técnica se conocen muchos ensayos para la determinación de una dosis administrada. Para los propósitos del presente documento, se podría utilizar un ensayo, que comprende comparar el grado en que se reducen los niveles de glucosa en sangre tras la administración de una dosis determinada del análogo de la presente descripción a un mamífero entre un conjunto de mamíferos, de los cuales a cada dado se administra una dosis diferente del análogo, para determinar una dosis de inicio para ser administrada a un mamífero. El grado en que se reducen los niveles de glucosa en sangre después de la administración de una determinada dosis puede ensayarse mediante procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento en el Ejemplo 4.

**[0240]** La dosis del análogo de la presente descripción también se determinará mediante la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que pueda acompañar a la administración de un análogo particular de la presente descripción. Típicamente, el médico a cargo decidirá la dosis del análogo de la presente descripción con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, el análogo de la presente descripción a administrar, la vía de administración, y la gravedad de la afección a tratar. A modo de ejemplo y sin pretender limitar la descripción, la dosis del análogo de la presente descripción puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal del sujeto a tratar/día, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,001 g/kg de peso corporal/día, o de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal/día.

**[0241]** En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cualquiera de los análogos descritos en el presente documento en un nivel de pureza adecuado para la administración a un paciente. En algunas realizaciones, el análogo tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99%, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica en algunos aspectos comprende el análogo de la presente descripción a una concentración de al menos A, en la que A es de aproximadamente 0,001 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml, 0 aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml o mayor. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende el análogo a una concentración de como máximo B, en la que B es aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 23, mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, o aproximadamente 0,1 mg/ml. En algunas realizaciones, las composiciones pueden contener un análogo a un intervalo de concentración de A a B mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 30,0 mg/ml.

Formas dirigidas

**[0242]** Un experto en la técnica entenderá fácilmente que los análogos de la descripción pueden modificarse en cualquier número de formas, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica del análogo de la presente descripción aumente a través de la modificación. Por ejemplo, el análogo de la presente descripción se puede conjugar directa o indirectamente a través de un enlazador a un grupo de reconocimiento. La práctica de la

conjugación de compuestos, por ejemplo, análogos de glucagón descritos en el presente documento, a grupos de reconocimiento se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadhwa et al., J Drug Targeting 3, 111-127 (1995) y la patente de Estados Unidos Nº 5.087.616. El término "grupo de reconocimiento", tal como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une a un receptor de superficie celular, de manera que el grupo de reconocimiento dirige la liberación del análogo de la presente descripción a una población de células en cuya superficie se expresa el receptor (el receptor de glucagón, el receptor de GLP-1). Los grupos de reconocimiento incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, y otros ligandos naturales o no naturales, que se unen a receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), etc.). 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 adicionalmente un enlace lábil que permite que las dos entidades se separen entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, grupos lábiles en medio ácido, grupos lábiles en medio básico y grupos escindibles por enzimas. El término "enlazador" en algunas realizaciones se refiere a cualquier agente o molécula que une el análogo de la presente descripción al grupo de reconocimiento. Un experto en la técnica reconoce que los sitios en el análogo de la presente descripción, que no son necesarios para la función del análogo de la presente descripción, son lugares ideales para la unión de un enlazador y/o un grupo de reconocimiento, siempre que el enlazador y/o grupo de reconocimiento, una vez unidos al análogo de la presente descripción, no interfieren con la función del análogo de la presente descripción, es decir, la capacidad de estimular la secreción de AMPc de las células, para tratar la diabetes o la obesidad .

#### Formulaciones de liberación controlada

**[0243]** Alternativamente, los análogos de glucagón descritos en este documento pueden modificarse en una forma de depósito, de manera que la forma en que el análogo de la presente descripción se libera en el organismo al que se administra está controlado con respecto al tiempo y la ubicación dentro de la cuerpo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos Nº 4.450.150). Las formas de depósito del análogo de la presente descripción pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende el análogo de la presente descripción y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que el análogo de la presente descripción es encapsulado por o difundido por todo el material y/o la degradación del material no poroso. El depósito se implanta entonces en la ubicación deseada dentro del cuerpo y el análogo de la presente descripción se libera desde el implante a una velocidad predeterminada.

**[0244]** La composición farmacéutica en ciertos aspectos se modifica para tener cualquier tipo de perfil de liberación in vivo. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación de liberación inmediata, liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación retardada, o de liberación bifásica. Los procedimientos de formulación de péptidos para la liberación controlada son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Qian et al, J Pharm 374: 46-52 (2009) y las publicaciones de solicitud de Patente Internacional Nº WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; y WO 1999/040942.

**[0245]** Las presentes composiciones pueden comprender además, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o efecto de liberación prolongado. Las formulaciones farmacéuticas descritas se pueden administrar según cualquier régimen incluyendo, por ejemplo, todos los días (1 vez por día, 2 veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día, 5 veces al día, 6 veces por día), cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanal, quincenal, cada tres semanas, mensual o bimensual.

#### Combinaciones

**[0246]** Los análogos de glucagón descritos en el presente documento pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos que tienen como objetivo tratar o prevenir cualquiera de las enfermedades o afecciones médicas descritas en este documento. Por ejemplo, los análogos de glucagón descritos en este documento pueden ser coadministrados con (simultánea o secuencialmente) un agente antidiabético o contra la obesidad. Los agentes anti-diabéticos conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen la insulina, la leptina, péptido YY (PYY), pancreático péptido (PP), factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), agonistas de los receptores Y2Y4, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), gliclazida (Amaryl), o gliclazida (Diamicon); meglitinidas, tales como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas, tales como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidindionas, tales como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos), o troglitazona (Rezulin), u otros inhibidores de PPAR $\gamma$ ; inhibidores de la alfa-glucosidasa que inhiben la digestión de hidratos de carbono, tales como el miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/acarbosa); exenatide (Byetta) o pramlintide; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), tales como vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador de glucosa 1 dependiente de sodio); activadores de la glucoquinasa (GKA); antagonistas del receptor de glucagón (GRA); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

[0247] Los agentes contra la obesidad conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen supresores del apetito, incluyendo estimulantes de tipo fenetilamina, fentermina (opcionalmente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropión (Tenuate ®), fendimetrazina (Prelu-2 ®, Bontril ®), benzfetamina (Didrex ®), sibutramina (Meridia ®, Reductil ®); rimonabant (Acomplia ®), otros antagonistas de los receptores de cannabinoides; oxitomodulina; clorhidrato de fluoxetina (Prozac); Qnexa (topiramato y fentermina), Excalia (bupropión y zonisamida) o Contrave (bupropión y naltrexona), o inhibidores de lipasa, similar a XENICAL (Orlistat) o Cetilistat (también conocido como ATL- 962), o GT 389-255.

[0248] Los péptidos descritos en este documento en algunas realizaciones son coadministrados con un agente para el tratamiento de enfermedad de hígado graso no alcohólico o NASH. Los agentes usados para tratar la enfermedad de hígado graso no alcohólico incluyen el ácido ursodesoxicólico (también conocido como Actigall, URSO, y Ursodiol), metformina (Glucophage), rosiglitazona (Avandia), Clofibrato, Gemfibrozilo, Polimixina B y Betaína.

[0249] Los péptidos descritos en este documento, en algunas realizaciones, se coadministran con un agente para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson. Los agentes contra la enfermedad del Parkinson son conocidos además en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, levodopa, carbidopa, anticolinérgicos, bromocriptina, pramipexol, y ropinirol, amantadina y rasagilina.

[0250] En vista de lo anterior, la descripción proporciona además composiciones farmacéuticas y kits que comprenden, además, uno de estos otros agentes terapéuticos. El agente terapéutico adicional se puede administrar simultánea o secuencialmente con el análogo de la presente descripción. En algunos aspectos, el análogo se administra antes del agente terapéutico adicional, mientras que en otros aspectos, el análogo se administra después del agente terapéutico adicional.

#### Usos

[0251] Se contempla que los análogos de glucagón descritos en el presente documento y las composiciones farmacéuticas relacionadas son útiles para el tratamiento de una enfermedad o afección médica, en la que por ejemplo, la falta de actividad en el receptor de glucagón, el receptor de GLP-1, o en ambos receptores, es un factor en la aparición y/o progresión de la enfermedad o afección médica. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica en un paciente, donde la enfermedad o afección médica es una enfermedad o afección médica en la que la falta de activación del receptor de GLP-1 y/o activación del receptor de glucagón están asociados con la aparición y/o progresión de la enfermedad o la afección médica. El procedimiento comprende proporcionar al paciente un análogo de acuerdo con cualquiera de los descritos en este documento en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección médica.

[0252] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección médica es el síndrome metabólico. El síndrome metabólico, también conocido como síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome de Reaven, es un trastorno que afecta a más de 50 millones de estadounidenses. El síndrome metabólico se caracteriza típicamente por una agrupación de al menos tres o más de los siguientes factores de riesgo: (1) la obesidad abdominal (tejido graso excesivo en y alrededor del abdomen), (2) la dislipidemia aterogénica (trastornos de grasa en la sangre incluyendo niveles altos de triglicéridos, bajo colesterol HDL y alto colesterol LDL que aumentan la acumulación de placa en las paredes de las arterias), (3) la presión arterial elevada, (4) resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, (5) estado protrombótico (por ejemplo, alto fibrinógeno o inhibidor-1 del activador de plasminógeno en sangre), y (6) estado proinflamatorio (por ejemplo, la proteína C reactiva elevada en la sangre). Otros factores de riesgo pueden incluir el envejecimiento, desequilibrio hormonal y la predisposición genética.

[0253] El síndrome metabólico se asocia con un aumento en el riesgo de enfermedad coronaria y otros trastornos relacionados con la acumulación de placa vascular, tal como un accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, que se refiere como enfermedades cardiovascular aterosclerótica (ASCVD). Los pacientes con síndrome metabólico pueden pasar de un estado de resistencia a la insulina en sus primeras etapas a diabetes de tipo II total con mayor riesgo de ASCVD. Sin pretender estar ligado por ninguna teoría en particular, la relación entre la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la enfermedad vascular puede implicar uno o más mecanismos patogénicos simultáneos, incluyendo alteración de la vasodilatación estimulada por la insulina, la reducción asociada con la resistencia a la insulina en la disponibilidad de NO debido al aumento del estrés oxidativo, y anomalías en las hormonas derivada de adipocitos, tales como la adiponectina (Lteif y Mather, Can J. Cardiol 20 (supl B): 66B-76B (2004)).

[0254] Según el Panel de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación de Colesterol Nacional (ATP III) del 2001, cualquiera de tres de las siguientes características en el mismo individuo cumplen los criterios de síndrome metabólico: (a) la obesidad abdominal (circunferencia de cintura de más de 102 cm en los hombres y más de 88 cm en las mujeres); (b) los triglicéridos séricos (150 mg/dl o superior); (c) el colesterol HDL (40 mg/dl o más bajo en los hombres y 50 mg/dl o menor en las mujeres); (d) la presión arterial (130/85 o más); y (e) de glucosa en sangre en ayunas (110 mg/dl o superior). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un individuo que tiene niveles

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

**[0255]** Para los propósitos de este documento, si una persona cumple con los criterios de uno o ambos de los criterios establecidos por el Panel de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación de Colesterol Nacional o la OMS, ese individuo es considerado como afectado por el síndrome metabólico.

**[0256]** Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los péptidos descritos en este documento son útiles para tratar el síndrome metabólico. Por consiguiente, la descripción proporciona un procedimiento para prevenir o tratar el síndrome metabólico, o la reducción de uno, dos, tres o más factores de riesgo de los mismos, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto un análogo descrito en el presente documento en una cantidad eficaz para prevenir o tratar el síndrome metabólico, o el factor de riesgo de los mismos.

**[0257]** En algunas realizaciones, el procedimiento trata una afección médica hiperglucémica. En aspectos de ejemplo, la afección médica hiperglucémica es diabetes, diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, o diabetes gestacional, ya sea dependiente de insulina o no dependiente de insulina. En algunos aspectos, el procedimiento trata la afección médica hiperglucémica mediante la reducción de una o más complicaciones de la diabetes, incluyendo la nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

**[0258]** En algunos aspectos, la enfermedad o afección médica es la obesidad. En algunos aspectos, la obesidad es la obesidad inducida por fármacos. En algunos aspectos, el procedimiento trata la obesidad mediante la prevención o la reducción de la ganancia de peso o el aumento de la pérdida de peso en el paciente. En algunos aspectos, el procedimiento trata la obesidad mediante la reducción del apetito, la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción de los niveles de grasa en el paciente, o la disminución de la velocidad de movimiento de los alimentos a través del sistema gastrointestinal.

**[0259]** Debido a que la obesidad está asociada con la aparición o progresión de otras enfermedades, los procedimientos de tratamiento de la obesidad son además útiles en los procedimientos de reducción de complicaciones asociadas con la obesidad, incluyendo la enfermedad vascular (enfermedad de la arteria coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, la reperfusión de isquemia, etc.), la hipertensión, la aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas. Por consiguiente, la descripción proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de estas complicaciones asociadas a la obesidad.

**[0260]** En algunas realizaciones, la enfermedad o afección médica es una enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD). La NAFLD se refiere a un amplio espectro de enfermedad hepática que va desde el hígado graso simple (esteatosis), a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), a cirrosis (cicatrización irreversible avanzada del hígado). Todas las etapas de NAFLD tienen en común la acumulación de grasa (infiltración grasa) en las células hepáticas (hepatocitos). El hígado graso simple es la acumulación anormal de un cierto tipo de grasa, triglicéridos, en las células hepáticas con ninguna inflamación o cicatrización. En NASH, la acumulación de grasa se asocia con grados variables de inflamación (hepatitis) y la cicatrización (fibrosis) del hígado. Las células inflamatorias pueden destruir las células del hígado (necrosis hepatocelular). En los términos "esteatohepatitis" y "esteatonecrosis", esteato se refiere a la infiltración de grasa, hepatitis refiere a la inflamación en el hígado, y la necrosis se refiere a las células hepáticas destruidas. NASH en última instancia puede conducir a la cicatrización del hígado (fibrosis) y a continuación la cicatrización avanzada irreversible (cirrosis). La cirrosis causada por NASH es la última etapa y la más grave en el espectro de NAFLD (Mendler, Michel, "Fatty liver: nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)," ed Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com 29 de agosto, 2005.).

**[0261]** La enfermedad hepática alcohólica, o enfermedad hepática inducida por el alcohol abarca tres enfermedades hepáticas patológicamente distintas relacionadas o causadas por el consumo excesivo de alcohol: hígado graso (esteatosis), hepatitis crónica o aguda, y la cirrosis. La hepatitis alcohólica puede ir desde una hepatitis leve, con pruebas anormales de laboratorio siendo la única indicación de enfermedad, disfunción hepática severa con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), varices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación anormal de la sangre y coma. Histológicamente, la hepatitis alcohólica tiene un aspecto característico, con degeneración globular de los hepatocitos, inflamación con neutrófilos y, a veces cuerpos de Mallory (agregaciones anormales de proteínas de filamentos intermedios celulares). La cirrosis se caracteriza anatómicamente por nódulos generalizados en el hígado combinados con fibrosis. (Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", sitio web de la Universidad de Columbia Medical Center).

**[0262]** Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los análogos descritos en este documento son útiles para el tratamiento de la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD, o en cualquier etapa de la misma, incluyendo, por

ejemplo, esteatosis, esteatohepatitis, hepatitis, inflamación hepática, NASH, cirrosis, o sus complicaciones. Por consiguiente, la descripción proporciona un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, hígado graso no alcohólico, o en cualquier etapa del mismo, en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición descrita en el presente documento en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD, o la etapa de los mismos. Tales procedimientos de tratamiento incluyen la reducción en uno, dos, tres o más de los siguientes: contenido de grasa en el hígado, la incidencia o la progresión de la cirrosis, la incidencia de carcinoma hepatocelular, los signos de inflamación, por ejemplo, niveles anormales de enzimas hepáticas (por ejemplo, aspartato aminotransferasa AST y/o alanina aminotransferasa ALT o LDH), la ferritina sérica elevada, bilirrubina sérica elevada y/o signos de fibrosis, por ejemplo, los niveles elevados de TGF-beta. En realizaciones preferidas, los péptidos se utilizan para tratar a los pacientes que han progresado más allá de hígado graso simple (esteatosis) y muestran signos de inflamación o hepatitis. Dichos procedimientos pueden dar lugar, por ejemplo, a la reducción de AST y/o los niveles de ALT.

[0263] GLP-1 y exendina-4 han demostrado tener algún efecto neuroprotector. La presente descripción también proporciona usos de las composiciones descritas en el presente documento en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo, pero no limitado a, la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, otros trastornos relacionados con desmielinización, demencia senil, demencia subcortical, demencia arteriosclerótica, demencia asociada al SIDA, u otras demencias, un cáncer del sistema nervioso central, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, apoplejía o isquemia cerebral, la vasculitis cerebral, la epilepsia, la enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, síndrome de Guillain Barre, la enfermedad de Wilson, enfermedad de Pick, trastornos neuroinflamatorios, encefalitis, encefalomiелitis o meningitis del virus, hongos u origen bacteriano, u otras infecciones del sistema nervioso central, enfermedades priónicas, las ataxias cerebelosas, la degeneración cerebelosa, síndromes de degeneración espinocerebelosa, ataxia de Friedreichs, ataxia telangiectasia, dismiotrofia espinal, parálisis supranuclear progresiva, distonía, espasticidad muscular, temblor, retinitis pigmentosa, degeneración estriatonigral, encefalomiopatías mitocondriales, lipofuscinosis ceroides neuronal, encefalopatías hepáticas, encefalopatías renales, encefalopatías metabólicas, encefalopatías inducidas por toxinas, y daño cerebral inducido por la radiación.

[0264] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección médica es la hipoglucemia. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente diabético y la hipoglucemia es inducida por la administración de insulina. En aspectos específicos, el procedimiento comprende proporcionar el análogo de la presente descripción en combinación con insulina de modo que el análogo amortigua los efectos hipoglucémicos de la administración en bolo de insulina.

[0265] En algunas realizaciones, los análogos de glucagón se utilizan en conjunción con la administración parenteral de nutrientes a los pacientes no diabéticos en un hospital, por ejemplo, a los pacientes que reciben nutrición parenteral o la nutrición parenteral total. Los ejemplos no limitantes incluyen los pacientes de cirugía, pacientes en estado de coma, los pacientes con enfermedad de las vías digestivas o un tracto gastrointestinal no funcional (por ejemplo, debido a la extirpación quirúrgica, el bloqueo o alteración de la capacidad de absorción, la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, obstrucción del tracto gastrointestinal, fístula en el tracto gastrointestinal, pancreatitis aguda, isquemia intestinal, cirugía gastrointestinal mayor, ciertas anomalías congénitas del tracto gastrointestinal, diarrea prolongada, o el síndrome de intestino corto debido a la cirugía, los pacientes en shock, y los pacientes sometidos a procesos de curación a menudo reciben la administración parenteral de hidratos de carbono junto con varias combinaciones de lípidos, electrolitos, minerales, vitaminas y aminoácidos. Los análogos de glucagón y la composición de la nutrición parenteral se pueden administrar al mismo tiempo, en diferentes momentos, antes de, o después de la otra, a condición de que el análogo de glucagón ejerza el efecto biológico deseado en el momento en que se está digiriendo la composición de nutrición parenteral. Por ejemplo, la nutrición parenteral se puede administrar, 1, 2 o 3 veces por día, mientras que el análogo de glucagón se administra una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez al mes.

[0266] Tal como se usa en este documento, los términos "tratar" y "prevenir", así como palabras procedentes de las mismas, no implican necesariamente el tratamiento o prevención al 100% o completo. Más bien, hay diferentes grados de tratamiento o prevención que un experto en la técnica reconoce por tener un potencial beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los procedimientos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionados por el procedimiento pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad o afección médica. Por ejemplo, con respecto a los procedimientos de tratamiento de la obesidad, el procedimiento en algunas realizaciones consigue una disminución en la ingesta de alimentos por un paciente o de los niveles de grasa en un paciente. También, para los propósitos del presente documento, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o afección de la misma.

[0267] Con respecto a los procedimientos anteriores de tratamiento, el paciente es cualquier huésped. En algunas realizaciones, el huésped es un mamífero. Tal como se utiliza en este documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier animal vertebrado de la clase Mammalia, incluyendo, pero no limitado a, cualquiera de los órdenes de monotremas, marsupial, y placentarios. En algunas realizaciones, el mamífero es uno de los mamíferos del orden

Rodentia, tales como ratones y hamsters y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. En ciertas realizaciones, los mamíferos son del orden de carnívoros, que incluye felinos (gatos) y caninos (perros). En ciertas realizaciones, los mamíferos son del orden de los artiodáctilos, incluyendo bovinos (vacas) y cochinos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluidos los equinos (caballos). En algunos casos, los mamíferos son del orden de los primates, Ceboids, o Simoids (monos) o de la orden de los antropoides (humanos y simios). En realizaciones particulares, el mamífero es un humano.

#### Kits

10 **[0268]** Los análogos de glucagón de la presente descripción se pueden proporcionar de acuerdo con una realización como parte de un kit. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporciona un kit para la administración de un análogo de glucagón, por ejemplo, un péptido agonista de glucagón, a un paciente en necesidad del mismo, en el que el kit comprende un análogo de glucagón tal como se describe en el presente documento.

15 **[0269]** En una realización, el kit se proporciona con un dispositivo para administrar la composición de glucagón a un paciente, por ejemplo, aguja de la jeringa, dispositivo en lápiz, inyector de chorro u otro inyector sin aguja. El kit puede incluir alternativa o adicionalmente uno o más recipientes, por ejemplo, viales, tubos, botellas, jeringas precargadas individuales o de múltiples cámaras, cartuchos, bombas de infusión (implantables o externas), inyectores de chorro, dispositivos en lápiz precargados y similares, que contienen opcionalmente el análogo de glucagón en una forma liofilizada o en una solución acuosa. En algunas realizaciones, los kits también incluirán instrucciones de uso. Según una realización, el dispositivo del kit es un dispositivo de dispensación en aerosol, en donde la composición viene preenvasada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización, la composición de glucagón estéril está preenvasada dentro de la jeringa.

25 **[0270]** Los siguientes ejemplos se dan meramente para ilustrar la presente invención y de ningún modo para limitar su alcance.

#### **EJEMPLOS**

30 **EJEMPLO 1**

##### **[0271]** *Síntesis de fragmentos peptídicos de glucagón*

##### *Materiales:*

35 **[0272]** Todos los péptidos descritos en el presente documento en los EJEMPLOS se amidaron a menos que se especifique lo contrario.

40 **[0273]** Se utilizó resina MBHA (resina de 4-metilbenzidrilamina poliestireno) durante la síntesis de péptidos. La resina MBHA, malla 100-180, poliestireno reticulado con DVB al 1%; carga de 0,7 a 1,0 mmol/g), aminoácido protegidos con Boc y protegidos con Fmoc se adquirieron en Midwest Biotech. Las síntesis de péptidos en fase sólida utilizando aminoácidos protegidos con Boc se realizaron en un sintetizador de péptidos Applied Biosystem 430A. La síntesis de aminoácidos protegidos con Fmoc se realizó utilizando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems Modelo 433.

45 *Síntesis de péptidos (aminoácidos Boc/escisión con HF):*

50 **[0274]** La síntesis de estos análogos se realizó en el sintetizador de péptidos Applied Biosystem Modelo 430A. Los péptidos sintéticos se construyeron mediante la adición secuencial de aminoácidos a un cartucho que contenía 2 mmol de aminoácido protegido con Boc. Específicamente, la síntesis se llevó a cabo utilizando acoplamiento individuales activados con DEPBT Boc. Al final de la etapa de acoplamiento, la peptidil-resina se trató con TFA para eliminar el grupo protector Boc N-terminal. Se lavó varias veces con DMF y este ciclo repetitivo se repitió el número deseado de etapas de acoplamiento. Después del ensamblaje, se eliminó la protección de la cadena lateral, Fmoc, mediante tratamiento con piperidina al 20% y la acilación se realizó utilizando DIC. La peptidil-resina al final de la síntesis completa se secó mediante el uso de DCM, y el péptido se escindió de la resina con HF anhidro.

55 **[0275]** Para la lactamización, se seleccionaron los grupos protectores ortogonales para Glu y Lys (por ejemplo, Glu (Fm), Lys (Fmoc)). Después de la eliminación de los grupos protectores y antes de escisión con HF, la ciclación se realizó tal como se describió anteriormente (véase, por ejemplo, la Publicación de solicitud de Patente Internacional No. WO2008/101017).

##### *Tratamiento con HF de la peptidil-resina*

65 **[0276]** La peptidil-resina se trató con HF anhidro HF, y esto normalmente produjo aproximadamente 350 mg (~ 50% de rendimiento) de un péptido desprotegido crudo. Específicamente, la peptidil-resina (30 mg a 200 mg) se colocó en el recipiente de reacción con fluoruro de hidrógeno (HF) para la escisión. Se añadieron 500 µl de p-cresol al

recipiente como un atrapador de iones carbonio. El recipiente se conectó al sistema HF y sumergió en la mezcla de metanol/hieloseco. El recipiente se evacuó con una bomba de vacío y se separaron por destilación 10 ml de HF al recipiente de reacción. Esta mezcla de reacción de la peptidil-resina y el HF se agitó durante una hora a 0°C, después de lo cual se creó un vacío y el HF fue evacuado rápidamente (10-15 min). El recipiente se retiró cuidadosamente y se llenó con aproximadamente 35 ml de éter para precipitar el péptido y para extraer el p-cresol y grupos protectores orgánicos de moléculas pequeñas resultantes del tratamiento con HF. Esta mezcla se filtró utilizando un filtro de teflón y se repitió dos veces para eliminar todo el exceso de cresol. Este filtrado se desechó. El péptido precipitado se disuelve en aproximadamente 20 ml de ácido acético al 10% (aq). Este filtrado, que contenía el péptido deseado, se recogió y se liofilizó.

[0277] Un análisis de HPLC analítica del péptido solubilizado en bruto se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones [4,6 X 30 mm Xterra C8, 1,50 ml/min, 220 nm, tampón A de TFA al 0,1%/ACN al 10%, tampón B TFA al 0,1%/100% de ACN, gradiente 5-95% de B durante 15 minutos]. El extracto se diluyó dos veces con agua y se cargó en una columna de fase inversa preparativa 2,2 X 25 cm Vydac C4 y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo en un sistema Waters HPLC (tampón A de TFA al 0,1%/ACN al 10%, tampón B de TFA al 0,1%/ACN al 10% y un gradiente de 0 a 100% de B durante 120 minutos a un caudal de 15,00 ml/min. El análisis por HPLC del péptido purificado demostraron una pureza mayor del 95% y se utilizó el análisis de espectro de masas por ionización con electrospray para confirmar la identidad del péptido.

#### Acilación de péptidos

[0278] Los péptidos acilados se prepararon de la siguiente manera. Los péptidos se sintetizaron sobre una resina de soporte sólido utilizando un sintetizador de péptidos CS Bio 4886 o Applied Biosystems 430A. Se utilizó química de neutralización tal como se describe por Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). Para los péptidos acilados, el residuo de aminoácido objetivo para ser acilado (por ejemplo, la posición diez, con respecto a la numeración de posición de los aminoácidos de SEQ ID NO: 3) fue sustituido por un residuo de lisina Fmoc N epsilon. El tratamiento del péptido protegido con BOC N-terminal completado con piperidina al 20% en DMF durante 30 minutos eliminó Fmoc/grupos formilo. El acoplamiento al residuo de lisina con epsilon amino libre se logró mediante el acoplamiento de un exceso molar de diez veces de cualquiera de un aminoácido espaciador protegido con Fmoc (por ejemplo, Fmoc-Glu-OtBu) o de la cadena de acilo (por ejemplo CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>14</sub>-COOH) y reactivo de acoplamiento PyBOP o DEPBT en DMF/DIEA. La eliminación posterior del grupo Fmoc del aminoácido espaciador es seguido por la repetición del acoplamiento con una cadena de acilo. El tratamiento final con 100% de TFA da como resultado la eliminación de cualquier grupo protector de cadena lateral y el grupo BOC N-terminal. Las resinas de péptido se neutralizaron con DIEA al 5%/DMF, se secaron, y después se escindieron del soporte utilizando HF/p-cresol, 95: 5, a 0°C durante una hora. Después de extracción con éter, se utilizó una solución (HOAc) al 5% de ácido acético para solvatar el péptido en bruto. A continuación, se verificó una muestra de la solución para que contenga el péptido de peso molecular correcto por ESI-MS. Los péptidos correctos se purificaron mediante RP-HPLC usando un gradiente lineal de acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) al 10%/TFA al 0,1% a TFA al 0,1% en 100% de CH<sub>3</sub>CN. Se utilizó una columna de proteínas Vydac C18 22 mm x 250 mm para la purificación. Los análogos peptídicos acilados generalmente completaron la elución mediante una relación de tampón 20:80. Las porciones se agruparon y se comprobó la pureza en una RP-HPLC analítica. Las fracciones puras se liofilizaron proporcionando péptidos sólidos blancos.

[0279] Si un péptido comprendía un puente de lactama y restos diana a acilar, la acilación se lleva a cabo como se describe anteriormente tras la adición de ese aminoácido a la cadena principal del péptido.

#### PEGilación de péptidos

[0280] Para la PEGilación de péptidos, se hizo reaccionar metoxi poli (etilenglicol)idoacetamida (NOF) de 40 kDa con un equivalente molar de péptido en urea 7 M, tampón Tris 50 mM-HCl utilizando la cantidad mínima de disolvente necesaria para disolver tanto el péptido como el PEG en una solución transparente (por lo general menos de 2 ml para una reacción con 2-3 mg de péptido). La agitación vigorosa a temperatura ambiente se inició durante 4-6 horas y la reacción se analizó por RP-HPLC analítica. Los productos PEGilados aparecieron claramente distintos del material de partida con tiempos de retención disminuidos. La purificación se realizó en una columna Vydac C4 con condiciones similares a las utilizadas para la purificación del péptido inicial. La elución se produjo en proporciones de tampón de 50:50. Se encontraron las fracciones de péptido PEGilado y se liofilizaron. Los rendimientos fueron superiores al 50%, variando por reacción.

#### Análisis utilizando espectrometría de masas

[0281] Los espectros de masas se obtuvieron usando un espectrómetro de masas cuadrupolo por electrospray Sciex API-III con una fuente de iones ESI estándar. Las condiciones de ionización que se utilizaron fueron las siguientes: ESI en el modo de ion positivo; voltaje de pulverización iónica, 3,9 kV; potencial de orificio, 60 V. El gas de nebulización y de cortina utilizado fue un flujo de nitrógeno de 9 l/min. Los espectros de masas se registraron a partir Thompson 600-800 a 0,5 Th por etapa y 2 ms de tiempo de reposo. La muestra (aproximadamente 1 mg/ml) se disolvió en acetonitrilo acuoso al 50% con ácido acético al 1% y se introdujo mediante una bomba de jeringa externa a la velocidad de 5 µl/min.

**[0282]** Cuando los péptidos fueron analizados en solución de PBS por ESI MS, que se desalaron primero usando una punta de extracción en fase sólida ZipTip que contenía 0,6 µl de resina C4, según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Millipore Corporation, Billerica, MA, ver la página web de Millipore en millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737).

*Análisis por Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):*

**[0283]** Los análisis preliminares se realizaron con estos péptidos en bruto para obtener una aproximación de sus tasas de conversión relativas en tampón de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH, 7,2) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y análisis de MALDI. Las muestras de péptidos en bruto se disolvieron en el tampón PBS a una concentración de 1 mg/ml. Se almacenó 1 ml de la solución resultante en un vial de 1,5 ml de HPLC que después se selló y se incubó a 37°C. Se extrajeron alícuotas de 100 µl en diversos intervalos de tiempo, se enfriaron a temperatura ambiente y se analizaron por HPLC.

**[0284]** Los análisis de HPLC se realizaron utilizando un sistema de cromatografía Beckman System Gold utilizando un detector UV a 214 nm. El análisis de HPLC se realizó en una columna C18 Vydac 150 mm x 4,6 mm. El caudal fue de 1 ml/min. Disolvente A contenía TFA al 0,1% en agua destilada, y el disolvente B contenía TFA al 0,1% en CH<sub>3</sub>CN al 90%. Se empleó un gradiente lineal (40% a 70% de B en 15 minutos). Los datos fueron recogidos y analizados mediante el software Peak Simple Chromatography.

**[0285]** Las tasas iniciales de hidrólisis se utilizaron para medir la constante de velocidad para la disociación de los respectivos profármacos. Las concentraciones del profármaco y el fármaco se estimaron a partir de sus áreas de los picos, respectivamente. Las constantes de velocidad de disociación de primer orden de los profármacos se determinaron trazando el logaritmo de la concentración del profármaco en varios intervalos de tiempo. La pendiente de esta gráfica proporciona la constante de velocidad "k". La vida media de la degradación de los diversos profármacos fueron calculados utilizando la fórmula de  $t_{1/2} = 0,693/k$ .

**EJEMPLO 2**

*Síntesis del péptido de SEQ ID No. 17*

**[0286]** El péptido de la SEQ ID No. 17 se sintetizó por fase sólida usando química de Fmoc/t-Bu. Para la preparación del péptido, se derivatizaron primero 0,5 g de 2-clorotritil-resina (malla 100-200, 1,18 mmol/g) (GL Biochem) por incubación con 0,8 equivalentes (eq.) de Fmoc-Gln(Trt)-OH, 4 eq. relativos a aminoácido de diisopropiletilamina ácido (DIPEA) en DCM seco (diclorometano) durante 2 horas. A continuación, se realizó el ensamblaje de la secuencia en un multisintetizador de péptidos Apex396 (Advanced Biotech). Todos los aminoácidos se disolvieron a una concentración 0,5 M en DMF (N,N-dimetil formamida). Las reacciones de acilación se realizaron durante 60 minutos con un exceso de 6 veces de aminoácido activado sobre los grupos amino libres de la resina. Se realizaron acilaciones dobles para Aib<sub>2</sub>, Aib<sub>16</sub>, Asp<sub>15</sub>, His<sub>1</sub>. Los aminoácidos se activaron con cantidades equimolares de HATU (hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio), solución 0,5 M en DMF, y un exceso molar de 2 veces de DIEA (N,N-diisopropiletilamina), solución 2 M en NMP (1-metil-2-pirrolidiona).

**[0287]** Los grupos protectores de cadena lateral fueron: terc-butilo para Asp y Glu, Ser, Thr y Tyr; tritilo para Asn, Gln e His; tert-butoxi-carbonilo para Lys, Trp; y, 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonylo para Arg; se utilizó Boc-His(Trt)-OH en la síntesis.

**[0288]** La lisina en la posición 10, a derivatizar en la cadena lateral, se incorporó como Lys(Alloc). En el extremo del ensamblaje se retiró el grupo protector Alloc y la síntesis se completó por condensación de los dos residuos de ácido γ-carboxiglutámico (4 eq.) y el ácido palmítico (4 eq.) utilizando HBTU (4 eq.; (hexafluorofosfato de O-benzotriazol-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio), y DIPEA (8 eq.) como activadores.

**[0289]** Al final de la síntesis, las resinas peptídicas secas se trataron individualmente con 25 ml de la mezcla de disociación, ácido trifluoroacético (TFA) al 88%, fenol al 5%, triisopropilsilano al 2% y agua al 5% durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y el volumen de la solución se redujo, a continuación se añadió a metil t-butil éter en frío con el fin de precipitar el péptido. Después de la centrifugación, los sedimentos de péptidos se lavaron con metil t-butil éter nuevo frío para eliminar los atrapadores orgánicos. El proceso se repitió dos veces. Los sedimentos finales se secaron, se resuspendieron en H<sub>2</sub>O, acetonitrilo al 20% y se liofilizaron.

**[0290]** Los péptidos en crudo se purificaron por HPLC de fase inversa usando columnas preparativas Waters XBridge C18 (50 x 150 mm, 5 µm) y utilizando como eluyentes (A) TFA al 0,1% en agua y (B) TFA al 0,1% en acetonitrilo. Se realizó una UPLC analítica en un cromatógrafo Waters con una columna BEH130, C18 Acquity, de 1,7 µm, 2,1 x 100 mm, (Waters), a 45°C, utilizando H<sub>2</sub>O, TFA al 0,1% (A) y CH<sub>3</sub>CN, TFA al 0,1% (B) como disolventes. El péptido purificado se caracterizó por espectrometría de masas por electrospray en un detector Waters SQ.

EJEMPLO 3

5 **[0291]** La capacidad de cada péptido para inducir AMPc se midió en un ensayo indicador basado en la luciferasa de luciérnaga. La producción de AMPc que es inducido es directamente proporcional al fragmento de glucagón que se une al receptor de glucagón o de GLP-1. Para el bioensayo se utilizaron células HEK293 cotransfectadas con el receptor de glucagón o el receptor de GLP-1, respectivamente, y el gen de luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc.

10 **[0292]** Las células fueron privadas de suero mediante el cultivo de 16 horas en medio esencial mínimo modificado con Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con suero de crecimiento bovino al 0,25% (Hyclone, Logan, UT) y a continuación se incubaron con diluciones en serie de fragmentos de glucagón durante 5 horas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> en placas "Biocat" recubiertas con poli-D-lisina de 96 pocillos (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación, se añadieron a cada pocillo 100 µl de reactivo sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin Elmer, Wellesley, MA). La placa se agitó brevemente, se incubó 10 min en luz y oscuridad, se midió el resultado en un contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones eficaces del 50% (EC50) se calcularon mediante el uso de software de Origin (OriginLab, Northampton, MA).

EJEMPLO 4

20 **[0293]** Los potencias agonistas *in vitro* del péptido de la SEQ ID NO. 17 se determinaron utilizando células de ovario de hámster chino (CHO-K1) que expresaban de forma estable GLP-1R, GCGR o GIPR humano. Se generaron grupos isogénicos de línea celular estable de GLP-1R y GCGR por Invitrogen® utilizando la tecnología de integración dirigida Jump-In®, mientras que las líneas CHO/GIPR estables se generaron a través de técnicas de clonación y transfección clásicas (integración aleatoria) con dilución limitada para la selección de clones. los péptidos se ensayaron *in vitro* por sus capacidades relativas para estimular la producción de AMPc en las diversas líneas celulares utilizando el kit de ensayo de AMPc XS+ DiscoverX Hithunter® (cat # 90-0075L) según las instrucciones del kit. Las concentraciones eficaces del 50% (EC50) del péptido se calcularon mediante una curva de 4 parámetros por análisis de regresión no lineal que se ajustó con el software GraphPad Prism 4 (GraphPad software, San Diego, CA) mediante el trazado de los valores de luminiscencia frente a dosis del péptido.

EJEMPLO 5

35 **[0294]** Los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos tal como se describe en la lista de secuencias se realizaron tal como se describe esencialmente en el Ejemplo 1 o 2, y posteriormente ensayaron por la actividad agonista *in vitro* en cada uno del receptor de glucagón y el receptor de GLP-1 tal como se describe esencialmente en el Ejemplo 3 o 4. En algunos casos, también se probó la actividad agonista *in vitro* en el receptor de GIP. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

40

45

50

55

60

65

TABLA 1

SEQ ID NO.	Secuencia	EC50 (nM) en el receptor de glucagón	EC50 (nM) en el receptor de GLP-1	EC50 (nM) en el receptor de GIP
12	HaibQGFTSDK( $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMDTK $\gamma$ Glu-amida	0,010	0,003	12,763
13	HaibQGFTSDYSKYLDERRAaibEFVC(40K-TE PEGWLLDTK $\gamma$ E-amida	2,806	0,567	139,639
14	HsQGFTSDK( $\gamma$ Glu-C16)SKYLDERAAQDFVQWLLDTK $\gamma$ Glu-amida	0,003	0,003	976
15	HaibQGFTSDK( $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMomDTKQ-ácido	0,006	0,005	1,901
16	HaibQGFTSDK( $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLLDTKQ-ácido	0,015	0,019	1,038
17	H aib QGFTSD K( $\gamma$ Glu- $\gamma$ Glu-C16) SKYLD aib RAAQDFVQWLMNTK $\gamma$ Glu-amida	0,11	0,075	> 2000

[0295] Los valores de  $EC_{50}$  para los péptidos de SEQ ID Nos. 12 - 16 se obtuvieron usando el procedimiento del Ejemplo 3. El valor de  $EC_{50}$  para el péptido de la SEQ ID NO 17 se obtuvo usando el procedimiento del Ejemplo 4.

[0296] Tal como se muestra en la Tabla 1, muchos de los péptidos muestran una  $EC_{50}$  en el receptor de GLP-1 en el rango nanomolar o picomolar.

#### EJEMPLO 6

[0297] Los ratones con obesidad inducida por dieta (DIO) se dividen en grupos de ocho ratones por grupo y se determina el peso corporal promedio inicial de cada grupo. A cada grupo de ratones se inyectó por vía subcutánea diariamente una dosis de un péptido o vehículo de control durante una semana. Los péptidos ensayados en este estudio fueron los péptidos de SEQ ID NOs: 12-16. Las dosis administradas variaban entre 1 y 10 nmol/kg para cada uno de los péptidos ensayados. El peso corporal, la composición corporal, la ingesta de alimentos, y los niveles de glucosa en sangre se determinaron periódicamente durante todo el período de ensayo.

[0298] Para determinar mejor el efecto de estos péptidos sobre los niveles de glucosa en sangre, se lleva a cabo un segundo experimento con ratones db/db. En este experimento, los ratones db/db se dividen en grupos de ocho ratones por grupo y se determina el peso corporal promedio inicial de cada grupo. A cada grupo de ratones se inyectó por vía subcutánea una dosis única de un péptido de una de las SEQ ID NOs: 12-16, en el que la dosis está dentro del intervalo de 3 a 30 nmol/kg. Se determinaron periódicamente el peso corporal, la composición corporal, la ingesta de alimentos, y los niveles de glucosa en sangre durante todo el período de ensayo.

#### EJEMPLO 7

[0299] Los efectos *in vivo* de ciertos péptidos descritos en el presente documento se confirmaron en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO) que se mantuvieron con una dieta alta en grasas durante 16 semanas y tenían un peso corporal inicial de ~ 47 g. A los ratones se les administró un vehículo de control o una dosis de un péptido al día durante nueve días. Los péptidos ensayados en este estudio incluyeron un péptido de SEQ ID NO: 12, un péptido de la SEQ ID NO: 17, un péptido de la SEQ ID NO: 18, y un péptido de SEQ ID NO: 19. Las dosis de cada péptido fueron variadas, cada uno de los péptidos de SEQ ID NO: 12, 17, y 19 se administró a una dosis de 3 nmol/kg o 9 nmol/kg, mientras que el péptido de la SEQ ID NO: 18 se administró a una dosis de 1 nmol/kg, 3 nmol/kg, o 9 nmol/kg. Se midió el cambio de peso corporal acumulativo (en gramos) cada día del estudio y los resultados se muestran en la Figura 1. Los datos se expresan como promedio  $\pm$  SEM.

[0300] Cada uno de los péptidos ensayados en este estudio mostró un efecto de disminución del peso corporal. Cada grupo de ratones a los que se les administró un péptido a una dosis de 3 nmol/kg o una dosis 9 nmol/kg mostraron un peso corporal disminuido (en comparación con ratones tratados con vehículo) ya en el día 1 del estudio. En el Día 9 del estudio, a los ratones que se les administró 3 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 12 mostraron una reducción aproximada de peso corporal del 5,3%, mientras que los ratones a los que se les administró una dosis de 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 12 mostraron una pérdida aproximada de peso corporal del 29,8%. En el Día 9 del estudio, los ratones a los que se les administró 3 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 17 mostraron una reducción aproximada del peso corporal del 9,6%, mientras que los ratones a los que se les administró 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 17 mostraron una pérdida aproximada de peso del 35,5%. En el Día 9 del estudio, los ratones a los que se les administró 3 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 18 mostraron una reducción aproximada del peso corporal del 12,3%, mientras que los ratones a los que se les administró 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 18 mostraron una pérdida aproximada de peso corporal del 26,8%. En el Día 9 de este estudio, los ratones a los que se les administró 3 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 19 mostraron una reducción aproximada de peso corporal del 8,1%, mientras que los ratones a los que se les administró 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 19 mostraron una pérdida aproximada de peso corporal del 31,5%.

[0301] Además del cambio de peso corporal acumulativo, se midieron niveles de glucosa ambiente de los ratones DIO. Tal como se muestra en la Figura 2, los ratones que se les administró una dosis de 3 nmol/kg o 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 18 mostraron una disminución significativa de la glucosa ambiente en el día 4 (-29% frente a vehículo;  $P < 0,05$ ). Los ratones que recibieron 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 19 mostraron una disminución aproximada del 40% en los niveles de glucosa en el día 4 (en comparación con los ratones de control con vehículo;  $P < 0,05$ ), una disminución aproximada del 39% en los niveles de glucosa en el Día 7 (en comparación con los ratones de control con vehículo;  $P < 0,05$ ), y una disminución aproximada del 26% en los niveles de glucosa en el día 9 (en comparación con los ratones de control con vehículo;  $P < 0,05$ ).

[0302] Los ratones que recibieron 9 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 17 mostraron una disminución aproximada del 48% en los niveles de glucosa en los días 4 y 7 (en comparación con los ratones de control con vehículo;  $P < 0,05$ ), una disminución aproximada del 45% de los niveles de glucosa en el día 9 (en comparación con los ratones de control con vehículo;  $P < 0,05$ ). Los ratones que recibieron 3 nmol/kg del péptido de la SEQ ID NO: 17 mostraron una reducción aproximada del 28% en los niveles de glucosa en el día 7 (en comparación con los ratones de control con vehículo,  $P < 0,05$ ) y una disminución aproximada del 19% en los niveles de glucosa en el día 9 (en comparación con los ratones de control con vehículo;  $P < 0,05$ ).

## EJEMPLO 8

5 **[0303]** Los efectos *in vivo* de un péptido tal como se describe en este documento se confirmaron en monos rhesus obesos mediante la administración diaria durante 21 días de un vehículo de control, un producto comercialmente disponible (liraglutida), un péptido de la SEQ ID NO: 20, o un péptido de SEQ ID NO: 17. La liraglutida se administró a una dosis de 20 µg/kg s.c., mientras que cada uno de los péptidos de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 20 se administró a una dosis de 3 µg/kg s.c. Todos los péptidos tienen una farmacocinética comparable (hasta/2 ~ 10 h) y una unión a proteína plasmática similar en monos rhesus (> 98%). Se midieron el peso corporal y la ingesta de alimentos.

15 **[0304]** Tal como se muestra en la Figura 3A, los monos obesos que fueron administrados con el péptido de SEQ ID NO: 17 mostraron una pérdida de peso superior (-1,2 kg frente a la línea de base y el vehículo,  $P < 0,05$ ), en comparación con liraglutida y al péptido de SEQ ID NO: 20.

20 **[0305]** Se observó una disminución significativa en la ingesta de alimentos (expresado como el % de cambio frente a línea base en la figura 3B.), después del tratamiento con liraglutida (-13,1 ± 1,9%) o con el péptido de la SEQ ID NO: 17 (- 25,7% ± 3,2%,  $P < 0,05$  frente a liraglutida). Después del lavado de una semana, los animales tratados con el péptido de SEQ ID NO: 17 recuperaron gran parte del peso que se perdió durante el tratamiento crónico (Día 28). En las Figuras 3A y 3B, los datos se expresan como promedio ± SEM. \*  $P < 0,05$  frente a vehículo,  $^{\wedge}P < 0,05$  péptido de SEQ ID NO: 17 frente a Liraglutida.

## EJEMPLO 9

25 **[0306]** Los efectos *in vivo* de un péptido de la invención se ensayaron en monos rhesus diabéticos (n = 7) que tenían entre 16 y 26 años y tenían un peso corporal promedio de ~ 22 kg. A los monos rhesus diabéticos (n = 7) que tenían entre 16 y 26 años con un peso corporal promedio de ~ 22 kg se les administró un vehículo de control, liraglutida, a una dosis de 10 µg/kg s.c. o un péptido de la SEQ ID NO: 17 a una dosis de 1 µg/kg s.c. durante 10 días.

30 **[0307]** Se midió el peso corporal durante el estudio y se encontró que no se observó efecto del peso corporal en estos animales durante el período de tratamiento.

35 **[0308]** Al final de cada tratamiento, se midió primero la glucemia en ayunas (FBG), seguido de una prueba de tolerancia tras la comida (MTT) para evaluar la tolerancia a la glucosa. Tal como se muestra en la figura 4, monos diabéticos tratados con el péptido de SEQ ID NO: 17 demostró una disminución significativa de FBG (120 ± 20 frente a 158 ± 15 mg/ml, péptido de SEQ ID NO: 17 frente a vehículo (-25%),  $P < 0,05$ ; Figura 4). Además, los monos tratados con el péptido de la SEQ ID NO: 17 demostraron una tolerancia a la glucosa mejorada durante MTT, en comparación con los monos de control del vehículo (Figura 4). Los datos se expresan en la Figura 4 como la media ± SEM. \*  $P < 0,05$  frente a vehículo.

40 **[0309]** El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se ha de interpretar que cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, que significa "incluyendo, pero no limitado a") a menos que se indique lo contrario.

45 **[0310]** La mención de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente servir como un procedimiento abreviado de referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo y cada punto final, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, y cada valor separado y punto final se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en este documento.

50 **[0311]** Todos los procedimientos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, "tal como") proporcionado en el presente documento, pretende meramente iluminar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como una indicación de cualquier elemento no reivindicado como esencial para la práctica de la invención.

55 **[0312]** Las realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el presente documento, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Las variaciones de estas realizaciones preferidas pueden resultar evidentes para los expertos en la técnica al leer la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos empleen tales variaciones según sea apropiado, y los inventores pretenden que la invención pueda llevarse a cabo de manera distinta a la descrita específicamente en este documento. Por consiguiente, la presente invención incluye todas las modificaciones y equivalentes de la materia expuesta en las reivindicaciones adjuntas al presente documento según lo permitido por la ley aplicable. Además, cualquier combinación de los elementos anteriormente descritos en todas las variaciones posibles de los mismos está

abarcada por la invención a menos que se indique lo contrario en este documento o se contradiga claramente por el contexto.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> DiMarchi, Richard  
 <120> Coagonistas de receptores de glucagón/GLP-1  
 10 <130> 31135/46342 PCT  
 <150> US-61/500,027  
 <151> 2011-06-22  
 15 <150> US-61/547,360  
 <151> 2011-10-14  
 <160> 22  
 20 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 25 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 30 <223> Glucagón humano natural  
 <400> 1  
 35 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr  
 20 25  
 40  
 <210> 2  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 45 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 50 <223> GLP-1  
 <400> 2  
 55 His Asp Glu Phe Glu Arg His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu  
 20 25 30  
 60  
 Val Lys Gly Arg Gly  
 35  
 65  
 <210> 3  
 <211> 33  
 <212> PRT

ES 2 636 445 T3

<213> Homo sapiens

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<223> GLP-2

<400> 3

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

15 Leu Ala Ala Arg Asp Phe Ile Asn Trp Leu Ile Gln Thr Lys Ile Thr  
20 25 30

Asp

20

<210> 4  
<211> 37  
<212> PRT  
25 <213> Homo sapiens

<220>  
30 <221> MISC\_FEATURE  
<223> Oxintomodulina

<400> 4

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 Asp Thr Lys Arg Asn  
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala  
35

45

<210> 5  
<211> 30  
<212> PRT  
50 <213> Homo sapiens

<220>  
55 <221> MISC\_FEATURE  
<223> GLP1 (7-36 amida)

<220>  
60 <221> MOD\_RES  
<222> (30)..(30)  
<223> Amidación C-terminal

<400> 5

65 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
1 5 10 15

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

5 <210> 6  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> GLP-1 (7-37 ácido)  
 <400> 6

15 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15

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

25 <210> 7  
 <211> 39  
 <212> PRT  
 <213> Heloderma suspectum

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Exendina-4  
 <400> 7

35 His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu  
 1 5 10 15

40 Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser  
 20 25 30

45 Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 35

50 <210> 8  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

55 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 8

60 Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala  
 1 5

65 <210> 9  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 9  
 Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 1 5 10  
 5  
 <210> 10  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 10 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 15 <400> 10  
 Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser  
 1 5 10  
 20  
 <210> 11  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 30 <400> 11  
 Lys Arg Asn Arg  
 1  
 35 <210> 12  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 45 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB  
 50 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-  
 Glu-gamma-Glu  
 55 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es AIB  
 60 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Xaa es gamma-Glu  
 65 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Amidación C-terminal

ES 2 636 445 T3

<400> 12

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

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

<210> 13  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB

25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (20)..(20)  
 <223> Xaa es AIB

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (24)..(24)  
 <223> Unido covalentemente a PEG

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Xaa es gamma-Glu

40 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Amidación C-terminal

45 <400> 13

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

Arg Arg Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Asp Thr Lys Xaa  
 55 20 25 30

<210> 14  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 60 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

65 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Ser

ES 2 636 445 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 5 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-Glu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 10 <222> (31)..(31)  
 <223> Xaa es gamma-Glu  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 15 <222> (31)..(31)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 14  
 20 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 25 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Thr Lys Xaa  
 20 25 30  
  
 <210> 15  
 <211> 31  
 30 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 35  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 40 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 45 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 50 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (27)..(27)  
 55 <223> Xaa es sulfóxido de metionina  
  
 <400> 15  
 60 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
  
 65 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Xaa Asp Thr Lys Gln  
 20 25 30  
  
 <210> 16

<211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 10 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 15 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu  
  
 <220>  
 20 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es AIB  
  
 25 <400> 16  
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
  
 30 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Thr Lys Gln  
 20 25 30  
  
 35 <210> 17  
 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 45 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 50 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu  
  
 <220>  
 55 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 60 <221> MOD\_RES  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Xaa es gamma-Glu  
  
 <220>  
 65 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (31)..(31)  
 <223> Amidación C-terminal

ES 2 636 445 T3

<400> 17

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

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

<210> 18  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 15 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-  
 30 Glu-gamma-Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (29)..(29)  
 35 <223> Amidación C-terminal

<400> 18

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

Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asp Thr  
 45 20 25

<210> 19  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Péptido sintético

55 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> D-Ser

60 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-  
 65 Glu

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 636 445 T3

<222> (29)..(29)  
 <223> Amidación C-terminal  
  
 <400> 19  
 5 His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Glu  
 1 5 10 15  
  
 10 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Leu Asp Thr  
 20 25  
  
 <210> 20  
 15 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 20 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 25 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 30 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-  
 Glu-gamma-Glu  
  
 <220>  
 35 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es AIB  
  
 <220>  
 40 <221> MOD\_RES  
 <222> (31)..(31)  
 <223> D-Glu  
  
 <400> 20  
 45 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
  
 50 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Lys Thr Lys Glu  
 20 25 30  
  
 <210> 21  
 55 <211> 31  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
  
 <220>  
 60 <223> Péptido sintético  
  
 <220>  
 65 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> Liraglutida  
  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE

ES 2 636 445 T3

<222> (20)..(20)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-Glu  
 5 <400> 21  
 His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly  
 1 5 10 15  
 10 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Arg Gly Arg Gly  
 20 25 30  
 15 <210> 22  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 25 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> Xaa es AIB  
 30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (10)..(10)  
 <223> Acilado con un grupo graso acilo C16 a través de un espaciador gamma-Glu-gamma-Glu  
 35 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (16)..(16)  
 <223> Xaa es AIB  
 40 <220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (28)..(28)  
 <223> Xaa es Orn  
 45 <400> 22  
 His Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Lys Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa  
 1 5 10 15  
 50 Arg Ala Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Xaa Asp Thr Lys Gln  
 20 25 30

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.
- 5 2. Péptido según la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Conjugado que comprende el péptido, según la reivindicación 1 ó 2, conjugado a un grupo heterólogo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en el que el conjugado muestra una mayor actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural, y muestra una selectividad al menos 100 veces mayor para el receptor de GLP-1 humano frente al receptor de GIP.
- 10 4. Conjugado, según la reivindicación 3, en el que el grupo heterólogo comprende uno o más de: un péptido, un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o fragmento del mismo, un polímero, un punto cuántico, una molécula pequeña, una toxina, un agente de diagnóstico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 5. Conjugado, según la reivindicación 3, en el que el grupo heterólogo es un péptido y el conjugado es un péptido de fusión o un péptido quimérico, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 20 6. Conjugado, según la reivindicación 5, que comprende una extensión de 1-21 aminoácidos C-terminales al aminoácido en la posición 31 del péptido, según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 25 7. Conjugado, según la reivindicación 6, en el que la extensión se selecciona del grupo que consiste en Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 9) o GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 10), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 30 8. Dímero o multímero que comprende el péptido, según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 35 9. Composición farmacéutica que comprende el péptido, según la reivindicación 1 ó 2, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un conjugado, según la reivindicación 3 a 7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; un dímero o multímero, según la reivindicación 8, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; o una combinación de los mismos, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 10. Composición farmacéutica, según la reivindicación 9, que comprende además un agente antidiabético o contra la obesidad.
11. Composición farmacéutica, según la reivindicación 9 ó 10, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o afección médica seleccionada del grupo que consiste en: síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa.

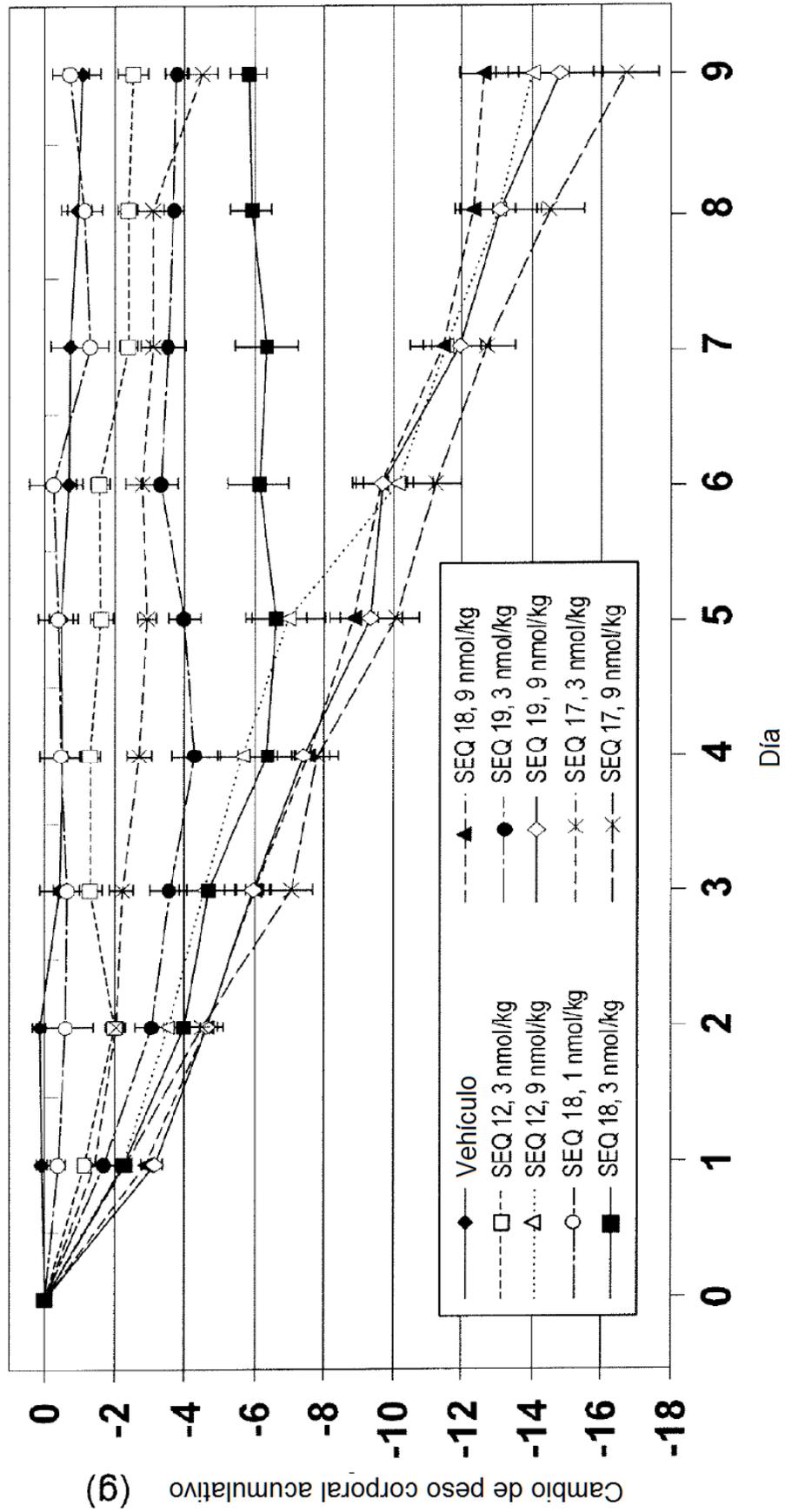


Figura 1

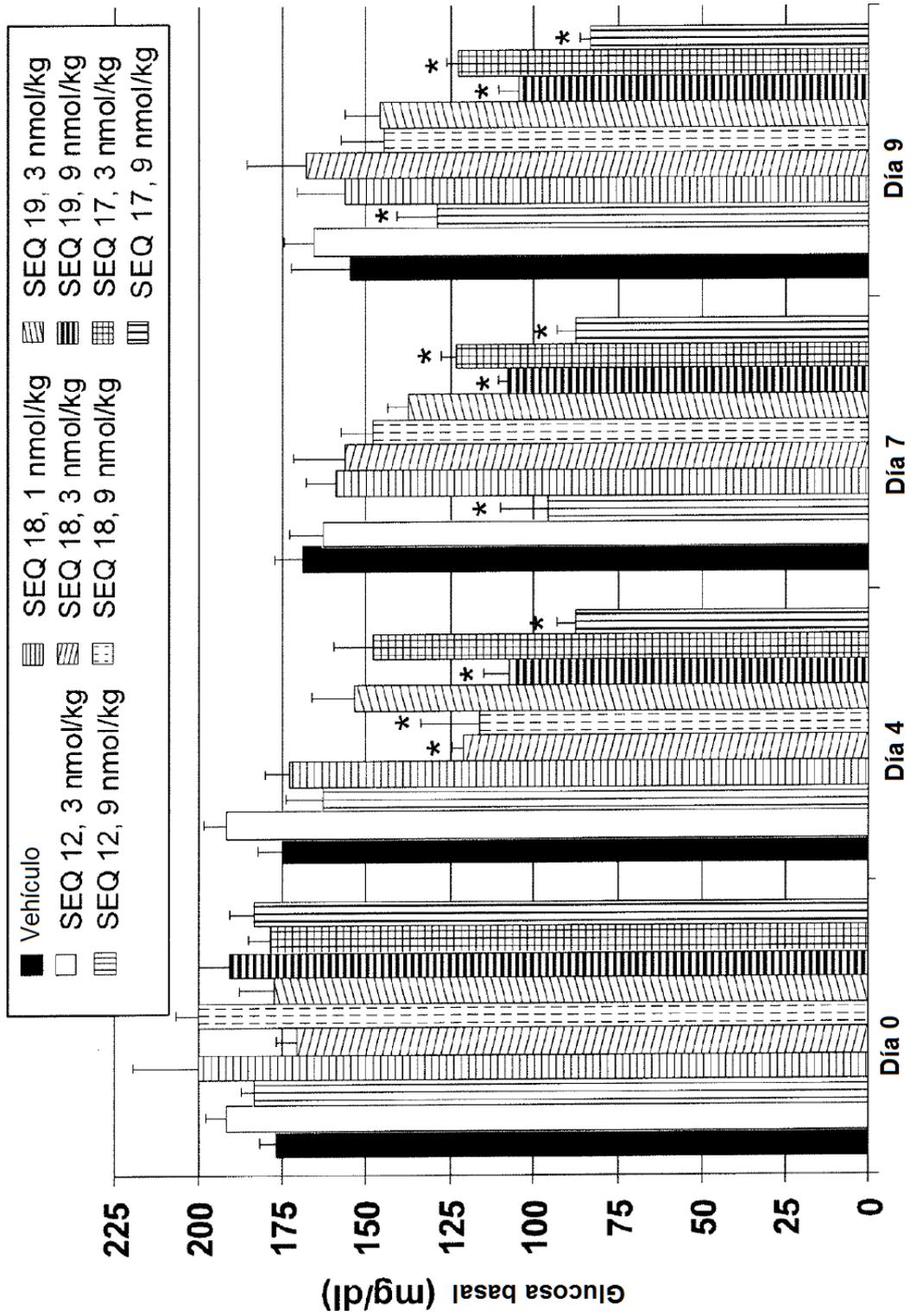


Figura 2

\*  $P < 0.05$  vs. vehículo

Figura 3A

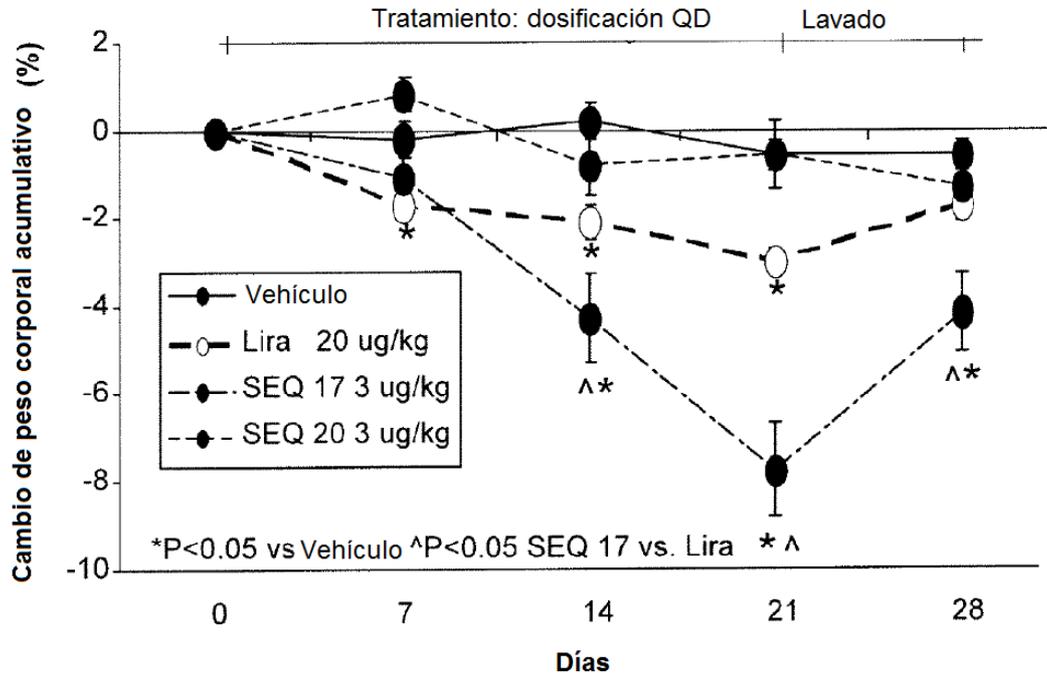
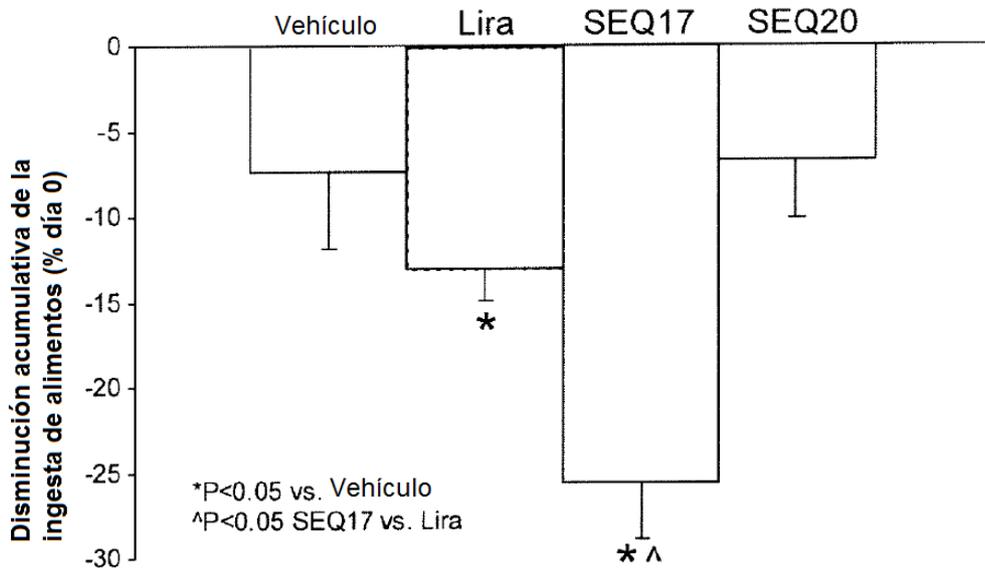


Figura 3B



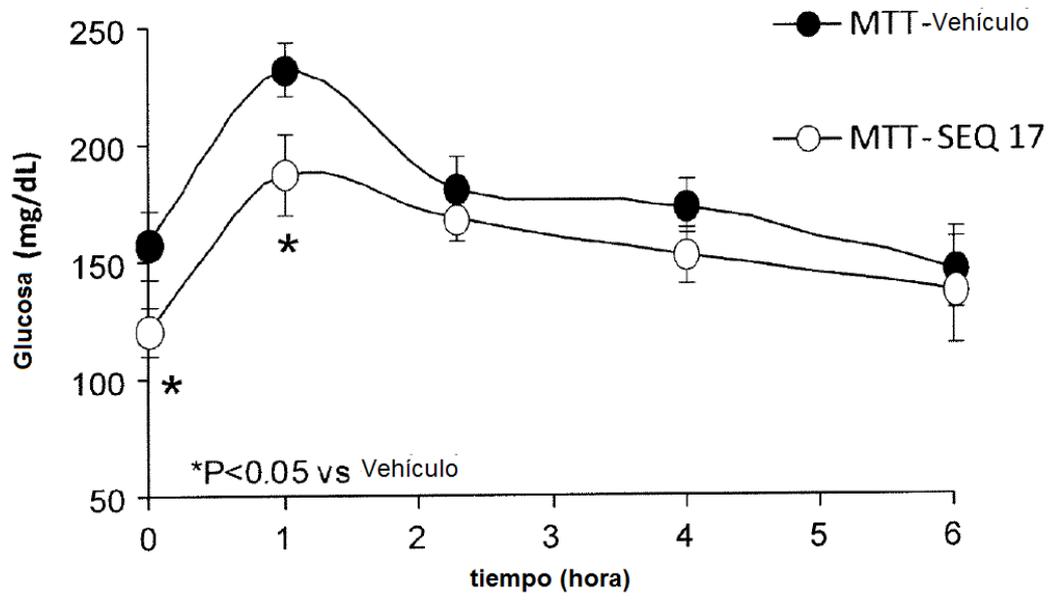


Figura 4