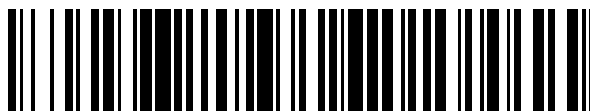


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 698 329**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2013 PCT/IB2013/003191**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14091316**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2013 E 13849992 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2931745**

54 Título: **Agonistas de glucagón/GLP-1 para el tratamiento de la obesidad**

30 Prioridad:

11.12.2012 US 201261735823 P

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

04.02.2019

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge CB21 6GH**

72 Inventor/es:

**AGORAM, BALAJI;
ANTONSSON, MADELEINE;
BEDNAREK, MARIA;
BURMEISTER, NICOLE;
BENTHEM, LAMBERTUS;
FAIRMAN, DAVID;
FRITSCH-FREDIN, MARIA;
JACKSON, RONALD;
LOFMARK, RASMUS, JANSSON y
METCALFE, JACQUELINE**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 698 329 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agonistas de glucagón/GLP-1 para el tratamiento de la obesidad

ANTECEDENTES

La obesidad supone un problema de salud importante y cada vez mayor a nivel mundial y se asocia con muchas enfermedades que pueden ser letales como una enfermedad cardiovascular, enfermedad renal, hipertensión, accidente cerebrovascular, infertilidad, insuficiencia respiratoria y diabetes de tipo 2.

El glucagón y el péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1, por sus siglas en inglés) derivan del proglucagón, un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa en diferentes tejidos para formar una serie de péptidos diferentes derivados del proglucagón, que incluyen el glucagón, péptido similar al glucagón de tipo 1 (GLP-1), péptido similar al glucagón de tipo 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM), los cuales participan en una gran variedad de funciones fisiológicas, que incluyen la homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico y el crecimiento intestinal, así como también la regulación de la ingesta de alimentos. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 33-61 del proglucagón (53-81 del preproglucagón), mientras que GLP-1 se produce como un péptido de 37 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 72-108 del proglucagón (92-128 del preproglucagón). La amida de GLP-1(7-36) o el ácido de GLP-1(7-37) son formas biológicamente activas de GLP-1, que presentan una actividad esencialmente equivalente en el receptor de GLP-1.

El glucagón es producido por el páncreas e interacciona con el receptor del glucagón ("glucR"). El glucagón actúa en el hígado para incrementar la glucosa en sangre mediante gluconeogénesis y glicogenólisis. Cuando la glucosa en sangre empieza a reducirse, el glucagón envía una señal al hígado para que descomponga glicógeno y libere glucosa, lo cual provoca que los niveles de glucosa en sangre aumenten hasta un nivel normal.

GLP-1 presenta diferentes actividades biológicas en comparación con el glucagón. Es secretado por las células L del intestino y se une al receptor de GLP-1. Sus actividades incluyen la estimulación de la síntesis y la secreción de insulina, la inhibición de la secreción de glucagón y la inhibición de la ingesta de alimentos.

Se ha demostrado que tanto el glucagón como GLP-1, que actúan como agonistas en sus receptores respectivos, son eficaces a la hora de perder peso. Ciertos análogos de GLP-1 están siendo comercializados o están en fase de desarrollo para el tratamiento de la obesidad, los cuales incluyen, p. ej., Liraglutida (VICTOZA® de Novo Nordisk) y Exenatida (Byetta® de Eli Lilly/Amylin).

Hjorth *et al.* (*Journal of Biological Chemistry*, vol. 269, n.º 48, páginas 30121-30124) describe cómo el reconocimiento selectivo de los receptores de glucagón y GLP-1 por sus ligandos está determinado por residuos situados en extremos opuestos de los ligandos peptídicos homólogos.

Se siguen necesitando más agentes para el tratamiento eficaz de la obesidad, por ejemplo, péptidos agonistas de glucagón/GLP-1 con una solubilidad, formulabilidad, estabilidad y eficacia mejoradas.

COMPENDIO BREVE

Esta exposición proporciona un péptido aislado que comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos:

HX2QGTFSTDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30;

donde X2 es G o S, X10 es Y o K, X12 es K, E, R o S, X13 es K o Y, X15 es D o E, X16 es S o G, X17 es E, R, Q o K, X18 es R, S o A, X20 es R, K o Q, X21 es D o E, X23 es V o I, X24 es A o Q, X27 es E o V, X28 es A o K y X30 es G o R (SEQ ID NO:4). En ciertos aspectos, X2 es S, X15 es D, X16 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO:5). En ciertos aspectos, si X17 es E, entonces X18 es R y, si X17 es R, entonces X18 es S (SEQ ID NOs:6 y 7). En ciertos aspectos, X10 es Y, X12 es K, X13 es K y X27 es V (SEQ ID NOs:8 y 9). En ciertos aspectos, X10 es K, X13 es Y y X27 es E (SEQ ID NOs:10 y 11). En ciertos aspectos, X12 es E (SEQ ID NOs:12 y 13), como alternativa, X12 es R (SEQ ID NOs:14 y 15). En ciertos aspectos, el péptido aislado comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 16. En ciertos aspectos, el péptido aislado comprende o está constituido por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17 o la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19. En ciertos aspectos, el péptido aislado comprende o está constituido por la SEQ ID NO: 18.

En ciertas realizaciones de los péptidos descritos anteriormente, el grupo carboxilo de X30 está amidado. En otras realizaciones, el grupo carboxilo es el ácido no modificado.

Cualquiera de los péptidos proporcionados en la presente puede comprender además uno o más aminoácidos modificados, por ejemplo, la adición de un resto acilo, por ejemplo, la modificación puede ser la adición de un resto palmitoilo en el grupo N(épsilon) de un residuo de lisina. En ciertas realizaciones, el grupo palmitoilo está unido al residuo de lisina mediante un conector de tipo gamma glutamato. Se han utilizado conectores alternativos, que incluyen la beta alanina y el ácido aminohexanoico. Existen otros conectores alternativos posibles, que incluyen conectores que contienen restos PEG cortos, por ejemplo, que contienen 2 o 4 unidades PEG.

En varias realizaciones, los péptidos aislados proporcionados en la presente se pueden unir a un receptor de glucagón, a un receptor de GLP-1 o tanto a un receptor de glucagón como de GLP-1. En ciertos aspectos, el receptor de glucagón es un receptor de glucagón humano y/o el receptor de GLP-1 es un receptor de GLP-1 humano. En ciertos aspectos, un péptido aislado como el que se proporciona en la presente se une a un receptor de glucagón humano con una CE50 en el ensayo 1 de cAMP (según se describe en la presente) inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM. En ciertos aspectos, un péptido aislado como el que se proporciona en la presente se une a un receptor de GLP-1 humano con una CE50 en el ensayo 1 de cAMP inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM.

En ciertos aspectos, un péptido aislado como el que se proporciona en la presente es un agonista de la actividad de GLP-1, un agonista de la actividad del glucagón o un agonista de la actividad tanto de GLP-1 como del glucagón. En algunas realizaciones, un péptido aislado como el que se proporciona en la presente se une tanto a un receptor del glucagón como a un receptor de GLP-1, y exhibe una actividad al menos aproximadamente 2 veces mayor respecto al ligando natural en el receptor de GLP-1 que en el receptor de glucagón. En una realización, el péptido presenta una potencia relativa de 5 a 10 veces mayor en el GLP1R, en comparación con GLP1, que en el receptor de glucagón, respecto al glucagón.

En ciertos aspectos, un péptido aislado como el que se proporciona en la presente puede comprender además un resto heterólogo asociado con el péptido. En algunos aspectos, el resto heterólogo es una proteína, un péptido, un dominio proteico, un conector, un polímero orgánico, un polímero inorgánico, un polietilenglicol (PEG), biotina, una albúmina, una albúmina de suero humano (HSA, por sus siglas en inglés), una porción de la unión de FcRn a HSA, un anticuerpo, un dominio de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo de dominio, un dominio de unión a albúmina, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido de unión, una estructura que no sea FnIII, un marcador epitópico, un polímero que sea un polipéptido recombinante, una citocina o cualquier combinación de dos o más de estos restos.

También se proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido aislado como el que se describe en la presente y un portador. Además, se proporciona un kit que incluye tal composición farmacéutica.

También se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección provocada o caracterizada por un exceso de peso corporal, donde el método incluye administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad eficaz de un péptido aislado como el que se proporciona en la presente o una composición que incluya tal péptido. En ciertos aspectos, la enfermedad o afección puede ser obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, prediabetes, un incremento de la glucosa en ayunas, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia (o una combinación de estos factores de riesgo metabólico), glucagonomas, enfermedad cardiovascular, p. ej., insuficiencia cardíaca congestiva, aterosclerosis, arterioesclerosis, enfermedad cardíaca coronaria o enfermedad arterial periférica; accidente cerebrovascular, insuficiencia respiratoria, enfermedad renal y cualquier combinación de estas. De acuerdo con el método, un péptido aislado como el que se describe en la presente se puede administrar por inyección, p. ej., inyección subcutánea. De acuerdo con el método, el péptido se puede administrar una vez al día. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

También se proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección provocada o caracterizada por un exceso de peso corporal, donde el método incluye administrar a un sujeto que necesite tratamiento una cantidad eficaz de un péptido aislado como el que se proporciona en la presente o una composición que incluya tal péptido. De acuerdo con el método, un péptido aislado como el que se describe en la presente se puede administrar por inyección, p. ej., inyección subcutánea. De acuerdo con el método, el péptido se puede administrar una vez al día. En ciertas realizaciones, el sujeto es un ser humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

La FIGURA 1 muestra el porcentaje medio de cambio en el peso corporal desde el día cero en ratones DIO tras la administración del péptido coagonista de glucagón/GLP-1 G730 para tres dosis diferentes, en comparación con el tratamiento de vehículo y el tratamiento con Liraglutida. Los pesos corporales de partida en los diferentes grupos fueron los siguientes: vehículo: 47.4 ± 3.7 g, G730 10 nmol/kg: 44.5 ± 2.2 g, G730 20 nmol/kg: 45.9 ± 3.6 g y G730 50 nmol/kg: 46.1 ± 2.4 g, respectivamente.

La FIGURA 2 muestra el porcentaje medio de cambio en el peso corporal desde el día cero en ratones DIO tras la administración del péptido coagonista de glucagón/GLP-1 G797 para tres dosis diferentes, en comparación con el tratamiento de vehículo y el tratamiento con Liraglutida. Los pesos corporales de partida en los diferentes grupos fueron los siguientes: vehículo: 47.4 ± 3.7 g, G797 5 nmol/kg: 47.5 ± 1.2 g, G797 20 nmol/kg: 47.4 ± 2.2 g y G797 50 nmol/kg: 47.2 ± 1.8 g, respectivamente.

La FIGURA 3 muestra el porcentaje medio de cambio en el peso corporal desde el día cero en ratones DIO tras la administración del péptido coagonista de glucagón/GLP-1 G812 con una dosis de 20 nmol/kg, en comparación con el tratamiento de vehículo y el tratamiento con Liraglutida. Los pesos corporales de partida en los diferentes grupos fueron los siguientes: vehículo: 47.4 ± 3.7 g y G812 20 nmol/kg: 49.2 ± 3.4 g, respectivamente.

5 La FIGURA 4 es una gráfica que compara el cambio en los resultados del peso corporal para los tres péptidos coagonistas de glucagón/GLP-1 presentados en las FIG. 1, 2 y 3.

La FIGURA 5 muestra el porcentaje medio de cambio en el peso corporal desde el día cero en ratones DIO tras la administración del péptido coagonista de glucagón/GLP-1 G796 para dos dosis diferentes, en comparación con el tratamiento de vehículo y el tratamiento con Liraglutida.

10 La FIGURA 6 muestra el porcentaje medio de cambio en el peso corporal desde el día cero en ratones DIO tras la administración del péptido coagonista de glucagón/GLP-1 G865 para dos dosis diferentes, en comparación con el tratamiento de vehículo y el tratamiento con Liraglutida.

15 La FIGURA 7 muestra el porcentaje medio de cambio en el peso corporal desde el día cero en ratones DIO tras la administración del péptido coagonista de glucagón/GLP-1 G933 para dos dosis diferentes, en comparación con el tratamiento de vehículo y el tratamiento con Liraglutida.

La FIGURA 8 es una gráfica que compara el cambio en los resultados del peso corporal para los tres péptidos coagonistas de glucagón/GLP-1 presentados en las FIG. 5, 6 y 7.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

20 A lo largo de esta exposición, el término “un” o “una” entidad se refiere a una o más de estas entidades; por ejemplo, se sobreentiende que “un polinucleótido” representa uno o más polinucleótidos. En este sentido, los términos “un” (o “una”), “uno/a o más” y “al menos un/a” se pueden utilizar indistintamente en la presente.

25 Adicionalmente, la expresión “y/o”, cuando se utiliza en la presente, se debe interpretar como una descripción específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. De este modo, se pretende que la expresión “y/o”, según se utiliza en una frase tal como “A y/o B” en la presente, incluya “A y B”, “A o B”, “A” (solo) y “B” (solo). Del mismo modo, se pretende que la expresión “y/o”, según se utiliza en una frase tal como “A, B y/o C”, englobe cada uno de los siguientes aspectos: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

30 Se sobreentiende que, siempre que los aspectos se describan en la presente con el lenguaje “que comprende”, también se proporcionarán aspectos análogos descritos en términos de “constituido por” y/o “constituido esencialmente por”.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que interpreta habitualmente un experto en la técnica con la que se relaciona esta exposición. Por ejemplo, el *Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology*, Juo, Pei-Show, 2.^a ed., 2002, CRC Press; *The Dictionary of Cell and Molecular Biology*, 3.^a ed., 1999, Academic Press; y el *Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology*, revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general con muchos de los términos utilizados en esta exposición.

40 Las unidades, los prefijos y los símbolos se denotan en su forma aceptada por el Sistema Internacional de Unidades (SI). Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de otro modo, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los títulos proporcionados en la presente no son limitaciones de los diferentes aspectos de la exposición, los cuales se pueden obtener haciendo referencia a la memoria descriptiva como un todo. Por consiguiente, los términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente haciendo referencia a la memoria descriptiva en su totalidad.

45 Se pretende que el término “polipéptido”, tal como se utiliza en la presente, englobe un “polipéptido” singular, así como también “polipéptidos” en plural, y comprende cualquier cadena o cadenas de dos o más aminoácidos. De este modo, un “péptido”, una “subunidad peptídica”, una “proteína”, una “cadena de aminoácidos”, una “secuencia de aminoácidos” o cualquier otra expresión utilizada para hacer referencia a una cadena o cadenas de dos o más aminoácidos, tal como se utilizan en la presente, se incluyen en la definición de un “polipéptido”, aunque cada una de estas expresiones puede tener un significado más específico. El término “polipéptido” se puede utilizar en lugar de cualquiera de estas expresiones o indistintamente con ellas. El término incluye además polipéptidos que han sufrido modificaciones tras la traducción o tras la síntesis, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización con grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica o modificación mediante aminoácidos no naturales.

50 Más específicamente, el término “péptido”, tal como se utiliza en la presente, engloba péptidos de longitud completa y fragmentos, variantes o derivados de estos, p. ej., un péptido agonista de GLP-1/glucagón (p. ej., con una longitud de

29, 30 o 31 aminoácidos). Un "péptido", tal como se describe en la presente, p. ej., un péptido agonista de GLP-1/glucagón, puede formar parte de un polipéptido de fusión que comprenda componentes adicionales tales como, p. ej., un dominio de Fc o un dominio de albúmina, para incrementar su semivida. Un péptido, según se describe en la presente, también se puede derivatizar mediante una serie de vías diferentes.

5 Los términos "fragmento", "análogo", "derivado" o "variante", cuando hacen referencia a un péptido agonista de GLP-1/glucagón, incluyen cualquier péptido que conserve al menos cierta actividad deseable, p. ej., la unión a receptores de glucagón y/o GLP-1. Los fragmentos de péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente incluyen fragmentos proteolíticos, fragmentos de delección que exhiben propiedades deseadas durante la expresión, purificación y/o administración a un sujeto.

10 El término "variante", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un péptido que difiere del péptido mencionado debido a sustituciones, delecciones, inserciones y/o modificaciones de aminoácidos. Las variantes se pueden producir utilizando técnicas de mutagénesis conocidas en la materia. Las variantes pueden contener, además o de forma alternativa, otras modificaciones, por ejemplo, un péptido se puede conjugar o acoplar, p. ej., fusionar con una secuencia de aminoácidos heteróloga u otro resto, p. ej., para incrementar su semivida, solubilidad o estabilidad. Los ejemplos de restos que se han de conjugar o acoplar con un péptido proporcionado en la presente incluyen, sin carácter limitante, albúmina, una región Fc de inmunoglobulina, polietilenglicol (PEG) y similares. El péptido también se puede conjugar o se puede producir acoplado con un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del péptido (p. ej., 6-His) o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido.

20 La expresión "identidad secuencial", tal como se utiliza en la presente, se refiere a una correlación entre dos o más secuencias de polinucleótido o entre dos o más secuencias de polipéptido. Cuando una posición en una secuencia está ocupada por la misma base de ácido nucleico o el mismo aminoácido en la posición correspondiente de la secuencia comparativa, se dice que las secuencias son "idénticas" en esa posición. El porcentaje de "identidad secuencial" se calcula determinando el número de posiciones en las que se encuentra la base de ácido nucleico idéntica o el aminoácido idéntico en ambas secuencias para obtener el número de posiciones "idénticas". A continuación, el número de posiciones "idénticas" se divide por el número total de posiciones en la ventana de comparación y se multiplica por 100 para obtener el porcentaje de "identidad secuencial". El porcentaje de "identidad secuencial" se determina comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de una ventana de comparación. Con el fin de alinear las secuencias de forma óptima para la comparación, la porción de una secuencia de polinucleótido o polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones denominadas huecos, mientras que la secuencia de referencia se mantiene constante. Una alineación óptima es aquella alineación que, incluso con huecos, produce el mayor número posible de posiciones "idénticas" entre la secuencia de referencia y la comparativa. El porcentaje de "identidad secuencial" entre dos secuencias se puede determinar utilizando la versión del programa "BLAST 2 Sequences", que se encuentra disponible en el Centro Nacional para Información Biotecnológica desde el 1 de septiembre de 2004; este programa incorpora los programas BLASTN (para la comparación de secuencias de nucleótido) y BLASTP (para la comparación de secuencias de polipéptido), los cuales se basan en el algoritmo de Karlin y Altschul (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(12):5873-5877, 1993). Cuando se utiliza "BLAST 2 Sequences", se pueden utilizar los parámetros que eran los parámetros por defecto el 1 de septiembre de 2004 para el tamaño de palabra (3), la penalización por la abertura de un hueco (11), la penalización por la extensión de un hueco (1), el *drop-off* de un hueco (50), el valor esperado (10) y cualquier otro parámetro requerido, incluida, sin carácter limitante, la opción de matriz.

40 Las expresiones "composición" o "composición farmacéutica" se refieren a composiciones que contienen un péptido agonista de GLP-1/glucagón proporcionado en la presente, junto con, p. ej., portadores, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables, para su administración a un sujeto que necesite tratamiento, p. ej., un sujeto humano que esté siendo tratado para la obesidad.

45 La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a composiciones que son, según el alcance del juicio médico bien fundado, adecuadas para ponerlas en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin producir una toxicidad excesiva ni otras complicaciones de forma acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable.

50 Una "cantidad eficaz" es aquella cantidad de péptido agonista de GLP-1/glucagón que se proporciona en la presente cuya administración a un sujeto, ya sea como una única dosis o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento, p. ej., el tratamiento de la obesidad. Una cantidad es eficaz, por ejemplo, cuando su administración da como resultado uno o más de los siguientes efectos: pérdida de peso o mantenimiento de peso (p. ej., prevención del aumento de peso), pérdida de grasa corporal, prevención o modulación de la hipoglucemia, prevención o modulación de la hiperglucemia, fomento de la síntesis de insulina o reducción del consumo de alimentos. Esta cantidad puede ser una dosis fija para todos los sujetos que se estén tratando o puede variar dependiendo del peso, la salud y el estado físico del sujeto que se esté tratando, el grado de pérdida de peso o mantenimiento de peso deseado, la formulación del péptido, una evaluación profesional de la situación médica y otros factores relevantes.

55 El término "sujeto" se refiere a cualquier sujeto, particularmente un sujeto mamífero, que necesite tratamiento con un péptido agonista de GLP-1/glucagón proporcionado en la presente. Los sujetos mamíferos incluyen, sin carácter limitante, seres humanos, perros, gatos, conejillos de Indias, conejos, ratas, ratones, caballos, ganado bovino, osos, vacas, primates, monos, orangutanes y chimpancés, etc. En una realización, el sujeto es un sujeto humano.

Un "sujeto que lo necesite", tal como se utiliza en la presente, se refiere a un individuo para el cual es deseable que sea tratado, p. ej., un sujeto obeso o un sujeto propenso a la obesidad para el cual es deseable que se le facilite la pérdida de grasa corporal o peso, el mantenimiento de la grasa corporal o el peso, o que se prevenga o minimice el aumento de peso durante un periodo de tiempo especificado.

- 5 Un "péptido agonista de GLP-1/glucagón", tal como se utiliza en la presente, es un péptido quimérico que exhibe una actividad en el receptor de glucagón de al menos aproximadamente un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o superior con relación al glucagón nativo y que exhibe además una actividad en el receptor de GLP-1 de aproximadamente al menos aproximadamente un 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% o superior con relación al GLP-1 nativo, en las condiciones del ensayo 1.
- 10 La expresión "glucagón nativo", tal como se utiliza en la presente, se refiere al glucagón de origen natural, p. ej., glucagón humano, que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1. La expresión "GLP-1 nativo" se refiere a GLP-1 de origen natural, p. ej., GLP-1 humano, y es una expresión genérica que engloba, p. ej., la amida de GLP-1(7-36) (SEQ ID NO: 2), el ácido de GLP-1(7-37) (SEQ ID NO: 3) o una mezcla de estos dos compuestos. Se pretende que una referencia general a "glucagón" o "GLP-1" en ausencia de ninguna otra designación, tal como se utiliza en la presente,
- 15 se refiera a glucagón humano nativo o GLP-1 humano nativo, respectivamente. A menos que se indique de otro modo, "glucagón" se refiere a glucagón humano y "GLP-1" se refiere a GLP-1 humano.

Péptidos agonistas de GLP-1/glucagón

En la presente se proporcionan péptidos que se unen tanto a un receptor de glucagón como a un receptor de GLP-1. En ciertas realizaciones, los péptidos proporcionados en la presente son coagonistas de la actividad del glucagón y GLP-1. Tales péptidos se denominan en la presente péptidos agonistas de GLP-1/glucagón. Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se proporcionan en la presente poseen actividad de GLP-1 y de glucagón con proporciones favorables para propiciar la pérdida de peso, prevenir el aumento de peso o mantener un peso corporal deseable, y poseen una solubilidad, formulabilidad y estabilidad optimizadas. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se proporcionan en la presente son activos en los receptores de GLP-1 humano y glucagón humano, en cierta realización la actividad relativa en comparación con el ligando natural en el receptor de GLP-1 es al menos aproximadamente 1 vez, 2 veces, 5 veces, 8 veces, 10 veces, 15 veces, 20 veces o 25 veces mayor que en el receptor de glucagón.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen presentan potencias deseables en los receptores de glucagón y GLP-1, y presentan potencias relativas deseables para propiciar la pérdida de peso. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen exhiben potencias *in vitro* en el receptor de GLP-1 como las mostradas por una CE50 en el ensayo 1 de cAMP (remítase al Ejemplo 2) inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen exhiben potencias *in vitro* en el receptor de GLP-1 como las mostradas por una CE50 en el ensayo de cAMP en un 4.4% de albúmina de suero humano (ensayo 2, remítase al Ejemplo 2) inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen exhiben potencias *in vitro* en el receptor de glucagón como las mostradas por una CE50 en el ensayo 1 de cAMP (remítase al Ejemplo 2) inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen presentan proporciones de potencias de GLP-1-R/glucR relativas, en comparación con los ligandos nativos, en el intervalo de aproximadamente 0.01 a 0.50, p. ej., de aproximadamente 0.02 a 0.30, p. ej., de aproximadamente 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.10, 0.11, 0.12, 0.13, 0.14, 0.15, 0.16, 0.17, 0.18, 0.19, 0.20, 0.21, 0.22, 0.23, 0.24, 0.25, 0.26, 0.27, 0.28 o 0.30 cuando se utiliza el ensayo 2.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen exhiben potencias *in vitro* en el péptido insulino-trópico dependiente de glucosa (péptido inhibitorio gástrico) (GIPR, por sus siglas en inglés) como las mostradas por una CE50 en el ensayo 1 de cAMP (remítase al Ejemplo 2) inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM,

inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen exhiben potencias *in vitro* en el GIPR como las mostradas por una CE50 en el ensayo de cAMP en un 4.4% de albúmina de suero humano (ensayo 2, remítase al Ejemplo 2) inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente poseen uno o más criterios de los siguientes: solubilidad aceptable, facilidad de formulación, estabilidad en plasma y propiedades farmacocinéticas mejoradas. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen son solubles en tampones estándar en un intervalo amplio de pH.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón son solubles en soluciones tampón habituales para una concentración de hasta 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml o superior, en sistemas tampón y un intervalo de fuerzas iónicas, p. ej., de 0.25 a 150 mM, que incluyen, sin carácter limitante, un tampón de fosfato, tampón de Tris, tampón de glutamato, tampón de acetato, tampón de succinato o tampón de histidina. Los tampones ilustrativos incluyen un tampón de glutamato 100 mM de pH 4.5, tampón de acetato 100 mM de pH 5, tampón de succinato 100 mM de pH 5, tampón de fosfato 100 mM de pH 6, tampón de histidina 100 mM de pH 6, tampón de fosfato 100 mM de pH 6.5, tampón de fosfato 100 mM de pH 7.0, tampón de histidina 100 mM de pH 7.0, tampón de fosfato 100 mM de pH 7.5, tampón de Tris 100 mM de pH 7.5 y tampón de Tris 100 mM de pH 8.0. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen son solubles en tampones estándar para una concentración de 0.8 mg/ml en un intervalo de pH, p. ej., de pH 4.0 a pH 8.0, p. ej., a un pH de 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 u 8.5. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen son solubles en tampones estándar desde un pH de 4.5 a 8.0, de 5.0 a 8.0, de 5.5 a 8.0, de 6.0 a 8.0, de 6.5 a 8.0, de 7.0 a 8.0, de 4.5 a 8.5, de 5.5 a 8.5, de 5.5 a 8.5, de 6.0 a 8.5, de 6.5 a 8.5 o de 7.0 a 8.5.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen se pueden formular en formulaciones farmacéuticas estándar. Las formulaciones ilustrativas incluyen, sin carácter limitante: Tris 0.1 M de pH 7.5, manitol 150 mM, pH de la formulación final = 7.2; Tris 0.05 M, arginina/prolina 50 mM, pH de la formulación final = 8.0; o tampón de fosfato sódico (pH 8)/ 1.85% p/v de propilenglicol, pH de la formulación final = 7.0. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen son solubles en estas u otras formulaciones para una concentración de hasta 0.5 mg/ml, 0.6 mg/ml, 0.7 mg/ml, 0.8 mg/ml, 0.9 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml o superior.

En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen son aceptablemente estables frente a proteasas en suero o plasma. Los productos de degradación comunes del glucagón o GLP-1 incluyen productos +1 (ácido) y productos de escisión de la DPP IV. Los productos con masa +1 se pueden originar a partir de la desamidación en los grupos amida de la glutamina o en el extremo C. Los productos de escisión se originan a partir de la acción de la proteasa DPP IV en plasma. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen siguen siendo estables en plasma para niveles de hasta un 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% después de 24 horas en plasma a 37 °C.

En la presente se proporciona un péptido agonista de GLP-1/glucagón que comprende la secuencia de aminoácidos:

HX2QGTFSTDX10SX12X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30;

donde X2 es G o S, X10 es Y o K, X12 es K, E, R o S, X13 es K o Y, X15 es D o E, X16 es S o G, X17 es E, R, Q o K, X18 es R, S o A, X20 es R, K o Q, X21 es D o E, X23 es V o I, X24 es A o Q, X27 es E o V, X28 es A o K y X30 es G o R (SEQ ID NO: 4). En ciertas realizaciones, se proporciona el péptido aislado mostrado anteriormente, donde X2 es S, X10 es Y o K, X12 es K, E, R o S, X13 es K o Y, X15 es D, X16 es S, X17 es E, R, Q o K, X18 es R, S o A, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X27 es E o V, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO:5). En ciertas realizaciones, se proporciona el péptido aislado mostrado anteriormente, donde X2 es S, X10 es Y o K, X12 es K, E, R o S, X13 es K o Y, X15 es D, X16 es S, si X17 es E y X18 es R, o si X17 es R y X18 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X27 es E o V, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 7, respectivamente). En ciertas realizaciones, se proporciona el péptido aislado mostrado anteriormente, donde X2 es S, X10 es Y, X12 es K, X13 es K, X15 es D, X16 es S, si X17 es E y X18 es R, o si X17 es R y X18 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X27 es V, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 9, respectivamente). En ciertas realizaciones, se proporciona el péptido aislado mostrado anteriormente, donde X2 es S, X10 es K, X12 es K, E, R o S, X13 es Y, X15 es D, X16 es S, si X17 es E y X18 es R, y si X17 es R y X18 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X27 es E, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 11, respectivamente). En ciertas realizaciones, se proporciona el péptido aislado mostrado anteriormente, donde X2 es S, X10 es K, X12 es E, X13 es Y, X15 es D, X16 es S, si X17 es E y X18 es R, o si X17 es R y X18 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X27 es E, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 13, respectivamente). En ciertas realizaciones, se proporciona el péptido aislado mostrado anteriormente, donde X2 es S, X10 es K, X12 es R, X13 es Y, X15 es D, X16 es S, si X17 es E y X18 es R, o si X17 es R y X18 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X27 es E, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, respectivamente).

Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente incluyen, sin carácter limitante, G730 (SEQ ID NO: 16), G797 (SEQ ID NO: 17), G849 (SEQ ID NO: 18), G933 (SEQ ID NO: 19), G865 (SEQ ID NO: 20), G796 (SEQ ID NO: 21), G812 (SEQ ID NO: 22) y G380 (SEQ ID NO: 23). Estos péptidos agonistas de GLP-1/glucagón se enumeran en la Tabla 1:

Tabla 1: secuencias de los péptidos de GLP-1/glucagón

Péptido	Secuencia	SEQ ID NO:
G730	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-amida X13 = K(gE-palm)	16
G797	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-amida X10 = K(gE-palm)	17
G849	HSQGT FTSDX SRYLD SRSAR DFVAW LEAGG-amida X10 = K(gE-palm)	18
G933	HSQGT FTSDX SEYLD SERAR DFVAW LEAGG-ácido X10 = K(gE-palm)	19
G865	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-amida X10 = K(gE-palm)	20
G796	HSQGT FTSDX SSYLD SRRAR DFVAW LEAGG-amida X10 = K(gE-palm)	21
G812	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFI AW LEKGR-amida X10 = K(gE-palm)	22
G380	HGQGT FTSDY SKYLD SXRAQ DFVQW LVAGG-amida X17 = K(gE-palm)	23
G931	HSQGT FTSDY SKXLD SERAR DFVAW LVAGG-ácido X13 = K(gE-palm)	24
G934	HSQGT FTSDX SKYLE GQAAK EFI AW LEKGR-ácido X10 = K(gE-palm)	25
G973	HSQGT FTSDX SSYLD SRSAR DFVAW LEAGG-ácido X10 = K(gE-palm)	26
GLP1	HAEGT FTSDV SSYLE GQAAK EFI AW LVKGR	SEQ ID NO: 2 (7-36 amida) /SEQ ID NO: 3 (7-37 ácido)
Glucagón	HSQGT FTSDY SKYLD SRR AQ DFVQW LMNT	SEQ ID NO: 1

K(gE-Palm) = Lisina con un grupo palmitoilo conjugado con el nitrógeno épsilon, mediante un conector de tipo ácido gamma glutámico.

Los péptidos G797 y G933 contienen ambos un residuo de glutamato en la posición 12 y conservan una actividad sólida en los receptores tanto del glucagón como de GLP-1, según se muestra en el Ejemplo 2. El residuo correspondiente es lisina en la exendina-4 y el glucagón, y es serina en GLP-1. Aunque no se cree que este residuo entre en contacto con el receptor, los cambios en su carga de positiva a negativa pueden modificar el entorno adyacente. Además, G797, G849 y G933 contienen un residuo de glutamato en la posición 27. El residuo 27 es lisina en la exendina 4 y es un residuo hidrófobo sin carga en GLP-1 (valina) y el glucagón (metionina). La lisina de la exenatida establece interacciones electrostáticas con el receptor de GLP-1 en los residuos Glu 127 y Glu24 (C.R.Underwood *et al. J Biol Chem* 285 723-730 (2010); S.Runge *et al. J Biol Chem* 283 11340-11347 (2008)). Aunque cabría esperar una pérdida de la potencia de GLP1R cuando la carga de la posición 27 se cambia a negativa, el cambio es compatible con la actividad de GLP1R en G797, G849 y G933.

Métodos de preparación. Esta exposición proporciona un método para preparar un péptido agonista de GLP-1/glucagón. Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se pueden preparar mediante cualquier método adecuado. Por ejemplo, en ciertas realizaciones los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se sintetizan químicamente mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, p. ej., mediante síntesis en fase sólida según describe Merrifield (1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149-2154). Se puede realizar una síntesis peptídica en fase sólida, p. ej., utilizando sintetizadores automatizados, empleando reactivos estándar, p. ej., según se explica en el Ejemplo 1.

Como alternativa, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se pueden producir de forma recombinante utilizando una combinación de vector/célula huésped conveniente, como bien sabe el experto en la técnica. Existen varios métodos disponibles para producir péptidos agonistas de GLP-1/glucagón de forma recombinante. En general, se inserta una secuencia de polinucleótido que codifica el péptido agonista de GLP-1/glucagón en un vehículo de expresión adecuado, p. ej., un vector que contenga los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada. El ácido nucleico que codifica el péptido agonista de GLP-1/glucagón se inserta en el vector en un marco de lectura adecuado. El vector de expresión se transfecta a continuación en una célula huésped adecuada, la cual expresará el péptido agonista de GLP-1/glucagón. Las células

huésped adecuadas incluyen, sin carácter limitante, bacterias, levaduras o células de mamífero. Se pueden utilizar varios sistemas de vector de expresión-huésped que se pueden adquirir de proveedores comerciales, para expresar los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón descritos en la presente.

5 **Modificaciones, conjugados, fusiones y derivaciones.** En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se estabilizan mediante modificaciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones, el grupo carboxilo del aminoácido C-terminal se amida. En ciertas realizaciones, el aminoácido C-terminal es glicina amidada, p. ej., G730, G797, G849, G865, G796, G812 y G380. En ciertas realizaciones, p. ej., G933, la glicina C-terminal es el ácido no modificado. En ciertas realizaciones, se proporcionan péptidos agonistas de GLP-1/glucagón en los que uno o más residuos aminoacídicos están acilados. Por ejemplo, en ciertas realizaciones los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente contienen uno o más residuos de lisina, en los que hay un resto de palmitoilo unido al grupo N(épsilon). En ciertas realizaciones, se incorpora un conector entre la lisina y el grupo palmitoilo. Este conector puede ser un grupo de tipo ácido gamma glutámico o un conector alternativo tal como, sin carácter limitante, beta alanina y ácido aminohexanoico. Se pueden utilizar diferentes métodos de acilación tales como la adición de colesterol o grupos miristoilo. En ciertas realizaciones, el resto palmitoilo se añade en la posición 13 (p. ej., G730). En ciertas realizaciones, el resto palmitoilo se añade en la posición 10 (p. ej., G797, G849, G933, G865, G796 y G812). En ciertas realizaciones, el resto palmitoilo se añade en la posición 17 (p. ej., G380).

Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente, p. ej., G730, G797, G849 y G933, se pueden palmitoilar para prolongar su semivida mediante su asociación con albúmina de suero, de este modo se reduce su tendencia a ser eliminados por vía renal, según se describe en el Ejemplo 1.

20 Como alternativa o de forma adicional, un péptido agonista de GLP-1/glucagón como el que se describe en la presente se puede asociar con un resto heterólogo, p. ej., para prolongar su semivida. El resto heterólogo puede ser una proteína, un péptido, un dominio proteico, un conector, un polímero orgánico, un polímero inorgánico, un polietilenglicol (PEG), biotina, una albúmina, una albúmina de suero humano (HSA), una porción de la unión de FcRn a HSA, un anticuerpo, un dominio de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo de dominio, un dominio de unión a albúmina, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido de unión, una estructura que no sea FnIII, un marcador epitópico, un polímero que sea un polipéptido recombinante, una citocina y una combinación de dos o más de estos restos.

30 Por ejemplo, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón se pueden fusionar con un polipéptido heterólogo. Los péptidos se pueden fusionar con proteínas, ya sea mediante una fusión y expresión génica recombinante o mediante conjugación química. Las proteínas que son adecuadas como pares para la fusión incluyen, sin carácter limitante, albúmina de suero humano, anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que incluyen la fusión de la porción Fc de los anticuerpos. GLP-1 se ha fusionado a estas proteínas con retención de su potencia (L. Baggio *et al.*, *Diabetes* 53 2492-2500 (2004); P. Barrington *et al.* *Diabetes, Obesity and Metabolism* 13 426-433 (2011); P. Paulik *et al.* Asociación Americana de la Diabetes 2012, Póster 1946). También se han descrito secuencias peptídicas recombinadas prolongadas para proporcionar al péptido una masa molecular elevada (V. Schellenberger *et al.* *Nature Biotechnol* 27 1186-1190 (2009); PASylation (EP2173890)). En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón se incorporan como la parte N-terminal de una proteína de fusión, con el par de fusión, p. ej., la albúmina o la porción Fc, en el extremo C-terminal. Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón que se describen en la presente también se pueden fusionar con péptidos o dominios proteicos tales como "Albudabs" que presentan afinidad por la albúmina de suero humano (M.S. Dennis *et al.* *J Biol Chem* 277 35035-35043 (2002); A. Walker *et al.* *Protein Eng Design Selection* 23 271-278 (2010)). Los expertos en la técnica estarán familiarizados con los métodos para fusionar péptidos agonistas de GLP-1/glucagón como los que se describen en la presente con un polipéptido heterólogo, p. ej., albúmina o una región Fc.

45 Se pueden conjugar otros restos heterólogos con los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón para estabilizar e incrementar adicionalmente su semivida. Para la fusión química, ciertas realizaciones se caracterizan por el mantenimiento de un extremo N libre, pero se pueden obtener puntos alternativos para la derivatización. Otro método alternativo consiste en derivatizar el péptido con un resto químico voluminoso tal como polietilenglicol (PEG) de peso molecular elevado. Un "péptido agonista de GLP-1/glucagón pegilado" contiene una cadena de PEG unida covalentemente a este. La derivatización de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón, p. ej., la pegilación, se puede realizar en la lisina que está palmitoílada o, como alternativa, en un residuo tal como una cisteína, que ha sido sustituida o incorporada por extensión para permitir la derivatización. Los formatos anteriores del péptido agonista de GLP-1/glucagón se pueden caracterizar *in vivo* y/o *in vitro* para determinar su potencia relativa y el equilibrio entre la activación del receptor de GLP-1 y de glucagón.

55 La expresión general "cadena de polietilenglicol" o "cadena de PEG" se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena lineal o ramificada, que se representa mediante la fórmula general $H(OCH_2CH_2)_nOH$, donde n es un número entero de entre 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o superior. Las cadenas de PEG incluyen polímeros de etilenglicol con un peso molecular total medio seleccionado a partir del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40 000 Daltons. El peso molecular medio de una cadena de PEG se indica con un número, p. ej., PEG-5000 se refiere a una cadena de polietilenglicol que tiene un peso molecular total medio de aproximadamente 5000.

60 La PEGilación se puede llevar a cabo mediante cualesquiera reacciones de PEGilación conocidas en la técnica.

Remítase, p. ej., a *Focus on Growth Factors*, 3: 4-10, 1992 y las solicitudes de patente europeas EP 0 154 316 y EP 0 401 384. La PEGilación se puede llevar a cabo utilizando una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de polietilenglicol reactiva (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo).

Los métodos para preparar péptidos agonistas de GLP-1/glucagón PEGilados incluyen en general los pasos de (a) hacer reaccionar un péptido agonista de GLP-1/glucagón o con polietilenglicol (tal como un derivado de tipo aldehído o éster reactivo de PEG) en unas condiciones mediante las cuales la molécula se una a uno o más grupos del PEG, y (b) obtener el o los productos de reacción.

Composiciones farmacéuticas

Además, se proporcionan composiciones, p. ej., composiciones farmacéuticas, que contienen una cantidad eficaz de un péptido agonista de GLP-1/glucagón como el que se proporciona en la presente, formuladas para el tratamiento de enfermedades metabólicas, p. ej., la obesidad.

Las composiciones de la exposición se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos. Los métodos de preparación adecuados se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19.^a edición, A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). La composición puede adoptar varias formas, que incluyen, sin carácter limitante, una solución acuosa, una emulsión, un gel, una suspensión, una forma liofilizada o cualquier otra forma conocida en la técnica. Además, la composición puede contener aditivos farmacéuticamente aceptables, que incluyen, por ejemplo, diluyentes, aglutinantes, estabilizantes y conservantes. Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto.

Los portadores que se pueden utilizar con las composiciones de la invención son muy conocidos en la técnica e incluyen, sin carácter limitante, p. ej., tiroglobulina, albúminas tales como albúmina de suero humano, toxoide del tétano y poliaminoácidos tales como poli-L-lisina, poliácido L-gutámico, influenza, proteína del núcleo del virus de la hepatitis B y similares. Se pueden utilizar varios portadores acuosos, p. ej., agua, agua tamponada, solución salina al 0.8%, glicina al 0.3%, ácido hialurónico y similares. Las composiciones se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales muy conocidas o se pueden filtrar de forma estéril. Una composición resultante se puede envasar para ser utilizada como tal o se puede liofilizar, combinándose el preparado liofilizado con una solución estéril antes de su administración. Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, según sea necesario, para aproximarse a las condiciones fisiológicas, tales como agentes tamponantes y para ajustar el pH, agentes para ajustar la tonicidad, agentes humectantes y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

Método para tratar la obesidad, sistemas modelo

Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón pueden combinar el efecto del glucagón, p. ej., la inhibición de la ingesta de alimentos o la regulación de los niveles de glucosa, con el efecto de GLP-1, p. ej., la inhibición de la motilidad gástrica o el fomento de la liberación de insulina. Por consiguiente, pueden actuar para acelerar la eliminación de tejido adiposo excesivo, inducir una pérdida de peso sostenible y mejorar el control glucémico. Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón también pueden actuar para reducir factores de riesgo cardiovascular tales como colesterol elevado, LDL-colesterol elevado o proporciones anómalas de HDL/LDL.

La exposición proporciona un método para tratar la obesidad o una enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad, que comprende administrar a un sujeto que necesite tratamiento un péptido agonista de GLP-1/glucagón como el que se describe en la presente. También se proporciona un péptido agonista de GLP-1/glucagón para el tratamiento de la obesidad o una enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad. Además, se proporciona el uso de un péptido agonista de GLP-1/glucagón como el que se proporciona en la presente en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la obesidad o una enfermedad o trastorno relacionado con la obesidad.

Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se pueden administrar para prevenir el aumento de peso, propiciar la pérdida de peso, reducir el exceso de peso corporal o tratar la obesidad (p. ej., mediante el control del apetito, la alimentación, la ingesta de alimentos, la ingesta calórica y/o el gasto energético), incluida la obesidad mórbida. Además, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se pueden utilizar para el tratamiento de otros trastornos metabólicos relacionados con la obesidad. Los ejemplos de otros trastornos relacionados con la obesidad incluyen, sin carácter limitante: resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, prediabetes, un incremento de la glucosa en ayunas, diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia (o una combinación de estos factores de riesgo metabólico), glucagonomas, enfermedades cardiovasculares tales como insuficiencia cardíaca congestiva, aterosclerosis, arterioesclerosis, enfermedad cardíaca coronaria o enfermedad arterial periférica, accidente cerebrovascular, insuficiencia respiratoria o enfermedad renal.

El "tratamiento" es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados, según se proporcionan en la presente, de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón descritos incluyen, sin carácter limitante, una reducción del peso corporal, disminución del aumento de peso, reducción del apetito, reducción o estabilización de los niveles de insulina en suero y glucosa en suero, una mejora, paliación, estabilización, disminución del alcance de enfermedades relacionadas con la obesidad o un retraso o una ralentización de la evolución de enfermedades relacionadas con la obesidad. El "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento

5 terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas en ciertas realizaciones. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno, así como también aquellos en los que se ha de prevenir el trastorno. El término "tratamiento" se refiere a la inhibición o reducción de un incremento de los síntomas relacionados con la obesidad (p. ej., aumento de peso) en comparación con la ausencia de tratamiento y no significa necesariamente que implique un cese completo de la afección relevante.

10 La vía de administración de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente puede ser, por ejemplo, oral, parenteral, por inhalación o tópica. El término "parenteral", tal como se utiliza en la presente, incluye, p. ej., la administración intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, rectal o vaginal. Otro ejemplo de una forma de administración es una solución para inyección, en particular para inyección o goteo intravenoso o intraarterial. Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se pueden administrar como una dosis única o como múltiples dosis. En ciertas realizaciones, un péptido agonista de GLP-1/glucagón se administra por inyección subcutánea.

15 Las formulaciones parenterales pueden ser una dosis en bolo única, una infusión o una dosis en bolo de carga seguida por una dosis de mantenimiento. Estas composiciones se pueden administrar en intervalos fijos o variables específicos, p. ej., una vez al día, o "según se necesiten". Las pautas posológicas también se pueden ajustar para que proporcionen la respuesta óptima deseada (p. ej., una respuesta terapéutica o profiláctica).

20 La cantidad de péptido agonista de GLP-1/glucagón que se ha de administrar puede ser determinada fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación teniendo en cuenta la exposición de la presente. Los factores que influyen sobre la vía de administración y la cantidad respectiva de péptido agonista de GLP-1/glucagón incluyen, sin carácter limitante, la gravedad de la enfermedad (p. ej., el grado de obesidad), el historial del sujeto, y la edad, altura, peso, salud y estado físico del sujeto que se está sometiendo a terapia. De forma similar, la cantidad de péptido agonista de GLP-1/glucagón que se ha de administrar dependerá de la vía de administración y de si el sujeto tomará una única dosis o múltiples dosis de este agente. En ciertas realizaciones, los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón proporcionados en la presente se pueden administrar una vez al día por inyección.

25 KITS

30 En otras realizaciones más, la presente exposición proporciona kits que comprenden péptidos agonistas de GLP-1/glucagón, los cuales se pueden utilizar para llevar a cabo los métodos descritos en la presente. En ciertas realizaciones, un kit comprende un péptido agonista de GLP-1/glucagón descrito en la presente y uno o más envases. Un experto en la técnica reconocerá fácilmente que los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón descritos se pueden incorporar fácilmente a uno de los formatos de los kits establecidos, los cuales son muy conocidos en la técnica.

Ejemplos

Ejemplo 1: síntesis, modificaciones y caracterización de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón

Lista de abreviaturas:

Boc:	<i>tert</i> -butiloxicarbonilo
35 <i>tert</i> -Bu:	<i>tert</i> -butilo
DCM:	diclorometano
DIC:	diisopropilcarbodiimida
Fmoc:	9-fluorenilmetoxicarbonilo
HOBt:	1-hidroxibenzotriazol
40 HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
Mtt:	4-metiltrilito
NMP:	<i>N</i> -metilpirrolidona
Pbf:	2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo
TFA:	ácido trifluoroacético
45 TIS:	triisopropilsilano
Trt:	trifenilmetilo, trilito

Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón se sintetizaron como se indica continuación. La elongación de las cadenas peptídicas en NovaSyn TGR o resina Fmoc-Wang precargada (NovaBiochem) se llevó a cabo con un sintetizador de

péptidos en fase sólida PRELUDE™ (Protein Technologies, Tucson, AZ, EE. UU.). Se aplicaron los protocolos suministrados por el fabricante para acoplar los ésteres de hidroxibenzotriazol con aminoácidos en *N*-metilpirrolidona (NMP). Se utilizó el grupo fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc) para la protección semipermanente de los grupos alfa-amino de los aminoácidos, mientras que las cadenas laterales se protegieron con *tert*-butilo (*tert*-Bu) para la serina, treonina, ácido aspártico, ácido glutámico, tirosina y con 2,2,4,6,7-pentametilidihidrobenzofuran-5-sulfonilo (Pbf) para la arginina y con tritilo (Trt) para la histidina. El grupo amino N-terminal de la histidina en la posición 1 se protegió con el grupo *tert*-butiloxicarbonilo (Boc). Se incorporó Lys(Mtt) en la cadena peptídica cuando fue necesaria una modificación química posterior de la cadena lateral.

Tras completar la elongación de la cadena peptídica, el grupo Mtt se eliminó lavando la resina-péptido con DCM que contenía un 2% de TFA y un 5% de TIS (10 x 7 ml, cada 0.5 min). Se llevó a cabo el acoplamiento de un resto lipídico a la cadena lateral de Lys en el sintetizador de péptidos PRELUDE™ utilizando DIC como reactivo de acoplamiento en presencia de HOBt.

Los péptidos se escindieron de la resina utilizando una mezcla de TFA:TIS:agua (95:2.5:2.5). Después de 2 h a temperatura ambiente, la resina de peptidilo se filtró, se lavó con TFA y los filtrados combinados se evaporaron a sequedad al vacío. El residuo se lavó disgregándolo con éter y el precipitado que se formó se filtró, se lavó con éter y se secó. Los péptidos crudos se disolvieron en ácido acético al 5% en agua y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa en una columna Polaris 3 C8-A acoplada a un sistema Varian 920-LC. Para el análisis, se utilizó un sistema de gradiente estándar de un 10 a un 90% de tampón B durante el transcurso de 15 min. El tampón A era TFA al 0.1% en agua y el tampón B era TFA al 0.1% en acetonitrilo. Los perfiles de HPLC se registraron a 210 nm. Las separaciones preparativas se realizaron en un sistema Varian ProStar con una columna semipreparativa C18 RP XBridge Waters. Para la separación, se utilizó el sistema de disolventes descrito anteriormente de agua y acetonitrilo, con un gradiente de un 30 a un 70% de tampón B durante el transcurso de 30 min. Los productos cromatográficamente homogéneos (pureza > 97%) se analizaron mediante espectrometría de masas por electronebulización (MassLynx, Waters).

Ejemplo 2: estudios *in vitro*

Producción de cAMP mediada por receptores de glucagón y GLP-1

Actividad biológica de los péptidos en un ensayo de actividad de cAMP basado en células (ensayo 1): La actividad biológica de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón sintetizados mediante el método del Ejemplo 1 se evaluó para determinar la actividad biológica, p. ej., la estimulación de una o más respuestas de los receptores celulares, mediante los siguientes métodos. Se generaron líneas celulares estables que expresaban el receptor de GLP-1 (GLP-1R), el receptor de glucagón (GCGR) o el receptor del péptido insulínico dependiente de glucosa (polipéptido inhibitorio gástrico) (GIPR) de ser humano, ratón, rata o perro en células HEK293s o CHO mediante métodos estándar. La activación peptídica de estos diferentes receptores provoca la producción posterior del mensajero secundario cAMP, que se puede medir en un ensayo de actividad funcional.

Los ensayos de cAMP se llevaron a cabo utilizando "medio de ensayo".

Medio de ensayo: 10% de FBS en DMEM (Gibco # 41966), que contiene IBMX 0.5 mM (Sigma # I7018).

Se utilizaron placas de 384 pocillos con baja unión de proteínas (Greiner # 781280) para llevar a cabo once diluciones en serie de 1 en 5 de las muestras de prueba, las cuales se prepararon en medio de ensayo. Todas las diluciones de las muestras se realizaron por duplicado.

Se descongeló rápidamente en un baño de agua un criovial congelado de células que expresaban el receptor de interés, estas se transfirieron a un medio de ensayo precalentado y se centrifugaron a 240xg durante 5 minutos. Se volvieron a suspender las células en medio de ensayo con una concentración optimizada (p. ej., las células hGCGR a 1×10^5 células/ml, y las células hGLP-1R y hGIPR a 0.5×10^5 células/ml).

A partir de la placa de dilución, se estampó una réplica de 5 μ l en una placa de 384 pocillos con fondo en forma de u con pocillos negros poco profundos (Corning # 3676). A esto, se le añadieron 5 μ l de suspensión celular y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se midieron los niveles de cAMP utilizando un kit HTRF dinámico 2 para cAMP que se puede adquirir de proveedores comerciales (Cisbio, Cat. # 62AM4PEJ), siguiendo el protocolo de dos pasos según las recomendaciones del fabricante. Resumiendo: se prepararon por separado criptato de anti-cAMP (fluoróforo dador) y cAMP-d2 (fluoróforo aceptor) diluyendo cada uno de ellos 1/20 en el tampón de conjugado y lisis proporcionado en el kit. Se añadieron 5 μ l de criptato de anti-cAMP a todos los pocillos de la placa de ensayo y se añadieron 5 μ l de cAMP-d2 a todos los pocillos excepto los pocillos de unión no específica (NSB, por sus siglas en inglés), a los cuales se añadió el tampón de conjugado y lisis. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora y a continuación se llevó a cabo su lectura en un Envision (Perkin Elmer) utilizando una longitud de onda de excitación de 320 nm y longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm.

En la Tabla 2 se muestran las secuencias de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón sintetizados y sus valores de

5

CE50 determinados en los ensayos de cAMP, realizados en “medio de ensayo”. Todos los péptidos de la Tabla 2 se sintetizaron con una amida C-terminal. Se sintetizaron péptidos agonistas de GLP-1/glucagón adicionales con un ácido C-terminal y los valores de CE50 determinados en los ensayos de cAMP, realizados en “medio de ensayo”, se muestran en la Tabla 3. En la Tabla 4 se muestran las CE50 para péptidos agonistas de GLP-1/glucagón adicionales, que se llevaron a cabo en “medio de ensayo”. Todos los péptidos de la Tabla 4 contienen una amida C-terminal, a menos que se designen como “ácido”, en cuyo caso contienen un ácido C-terminal.

Tabla 2: actividad de cAMP de péptidos agonistas de GLP-1/glucagón con amida C-terminal (ensayo 1)

Péptido	Ensayo en medio de ensayo		
	CE50 para GlucR humano	CE50 para GLP1R humano	CE50 para GIPR humano
	M	M	M
G730	6.23E-12	1.8E-11	4.5E-08
G797	6.14E-12	1.4E-11	3.4E-09
G849	2.26E-12	9.0E-12	1.7E-08
G865	1.26E-11	8.3E-12	2.2E-08
G796	1.76E-12	1.3E-11	1.4E-08
G812	8.17E-12	1.1E-11	2.7E-09
G380	2.17E-10	7.7E-11	1.3E-07
GLP1		8.1E-11	
Glucagón	3.3E-12		

Tabla 3: actividad de cAMP de péptidos agonistas de GLP-1/glucagón con ácido C-terminal (ensayo 1)

Péptido	CE50 para GlucR humano	CE50 para GLP1R humano	CE50 para GIPR humano
	M	M	M
G931	1.78E-11	1.30E-10	0.00E+00
G933	5.92E-12	3.20E-11	9.70E-09
G934	6.30E-12	1.80E-11	3.60E-09
G973	8.90E-12	1.20E-11	4.70E-08

Tabla 4: actividad de cAMP de péptidos agonistas de GLP-1/glucagón adicionales (ensayo 1)

Los péptidos de secuencia original HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LVAGG en esta sección contienen todos ellos LVAGG en los residuos 26-30				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Sitio y naturaleza de la palmitoilación, sustituciones en la secuencia original
	CE50 M	CE50 M	CE50 M	
Glucagón	3.3E-12	4.2E-09	1.99E-07	
GLP-1	1.55E-07	8.1E-11	1.53E-07	
g715	2.53E-12	2.04E-11	9.98E-10	K(gE-palm)10

ES 2 698 329 T3

g716	2.46E-09	1.29E-08	1.18E-08	K(gEpalm)11
g702	1.49E-09	3.35E-09	0.00E+00	K(gEpalm)12, E17
g728	2.44E-09	1.69E-10	3.95E-07	K(gEpalm)12, E17 R20 A24
g729	3.19E-11	7.29E-11	2.09E-07	K(gEpalm)13 E17
g730	1.50E-11	3.95E-11	5.66E-08	K(gEpalm)13 E17 R20 A24
g875	1.29E-10	2.98E-11	2.90E-08	K(gEpalm)13 R20 A24, E17 Aib2
g841	no hay datos			K(gEpalm)13 R20 A24, S18 R12 ácido
g802	1.81E-09	9.64E-11	9.12E-08	K(gEpalm)13, R20 A24, E17, E12
g820	1.17E-11	3.39E-11	7.11E-08	K(gEpalm)13, R20 A24, E17, R12
g842	8.31E-12	5.12E-11	8.83E-08	K(gEpalm)13, R20 A24, E17, R12 ácido
g733	6.20E-08	2.31E-11	8.17E-07	K(gEpalm)14, G2 E3
g803	1.08E-11	2.96E-11	3.29E-08	K(gEpalm)14, R20 E24, S18
g843	no hay datos			K(gEpalm)14, R20 E24, S18 R12 ácido
g732	3.96E-11	2.32E-11	2.94E-08	K(gEpalm)14, R20 A24, E17 G2
g777	1.24E-12	2.74E-11	4.53E-09	K(gEpalm)14, R20 A24, E17
g844	no hay datos			K(gEpalm)14, R20 A24, E17 R12 Aib2 ácido
g845	no hay datos			K(gEpalm)14, R20 A24, E17 R12 ácido
g821	4.63E-12	5.58E-11	1.40E-08	K(gEpalm)14, R20 A24, E17, R12
g846	3.41E-11	4.38E-11	1.18E-08	K(gEpalm)14, R20 A24, E17, E12
g731	2.77E-11	4.22E-11	4.07E-08	K(gEpalm)14, E12
g670	8.00E-12	2.03E-11	1.49E-08	K(gEpalm)14, S18
g335	1.05E-11	7.33E-11	5.82E-07	K(gE-palm)17
g336	1.77E-12	3.66E-11	1.96E-08	K(gE-gE-palm)17
g384	4.29E-11	2.72E-11	1.70E-08	K(gEpalm)17, Aib2
g380	3.62E-10	1.00E-10	6.09E-07	K(gEpalm)17, G2
g736	9.19E-10	8.54E-11	0.00E+00	K(gEpalm)17, G2, A20 A24
g381	1.93E-09	9.08E-11	5.45E-07	K(gEpalm)17, E3
g678	4.52E-09	1.06E-10	1.23E-07	K(gEpalm)17, G2 E20
g599, g688	6.98E-11	1.20E-10	1.12E-07	K(gEpalm)17, E20
g679	1.89E-10	1.35E-10	1.17E-07	K(gEpalm)17, G2 E24
g600, g689	5.47E-12	6.66E-11	8.28E-08	K(gEpalm)17, E24
g680	3.68E-09	1.95E-10	9.67E-08	K(gEpalm)17, G2 E20 E24
g639	8.21E-08	2.44E-10	8.21E-08	K(gEpalm)17, S2 E3 E20 E24
g681	3.99E-08	2.83E-10	1.24E-07	K(gEpalm)17, G2, E3 E20 E24
g720	3.52E-10	5.34E-11	0.00E+00	K(gEpalm)17, G2 R20 E24 R12

ES 2 698 329 T3

g660	1.52E-09	1.06E-09	3.32E-07	K(gEpalm)17, G2 R20 E24
g835	4.24E-10	1.91E-10	9.72E-08	K(gEpalm)17, R20 E24, E12
g776	4.65E-12	7.02E-11	4.79E-08	K(gEpalm)17, R20 E24
g823	9.48E-12	9.73E-11	8.42E-08	K(gEpalm)17, R20 E24, R12
g867	7.04E-12	4.48E-11	4.17E-08	K(gEpalm)17, R20 A24
g736	9.20E-10	8.54E-11	0.00E+00	K(gEpalm)17, A20 A24, G2
g737	7.34E-07	8.14E-11	0.00E+00	K(gEpalm)17, A20 A24, G2 E3
g675	3.84E-08	1.51E-10	1.61E-06	K(gEpalm)17, E12 R20 A24 G2
Los péptidos de secuencia original HSQGT FTSDY SKYLD SRRAQ DFVQW LEAGG en esta sección contienen todos ellos la secuencia LEAGG desde el residuo 26 en adelante a menos que se indique de otro modo, p. ej., LERGG				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Sitio y naturaleza de la palmitoilación, sustituciones en la secuencia original
	CE50 M	CE50 M	CE50 M	
g717	4.55E-13	5.77E-12	1.48E-09	K(gEpalm)10, LEAGG
g796	1.81E-12	1.40E-11	1.74E-08	K(gEpalm)10, LEAGG, R20 A24 S12
g847	no hay datos			K(gEpalm)10, LEAGG, R20 A24 S18 E12 Aib2 ácido
g797	9.64E-12	2.26E-11	4.64E-09	K(gEpalm)10, LEAGG, R20 A24 E17 E12
g798	5.10E-13	9.07E-12	1.51E-09	K(gEpalm)10, LEAGG, R20 A24 E17
g848	9.66E-13	9.42E-12	2.77E-09	K(gEpalm)10, LEAGG, R20 A24 E17 R12
g849	2.28E-12	9.07E-12	1.81E-08	K(gEpalm)10, LEAGG, R20 A24 S18 R12
g701	3.83E-09	7.40E-09	0.00E+00	K(gEpalm)12, LERGG, G2 E17
g840	5.30E-12	1.45E-10	1.02E-07	LEAGG, R20 A24, E17
g824	1.05E-12	4.71E-11	5.74E-08	K(gEpalm)14, LEAGG, R20, E24
g780	7.92E-13	1.20E-11	6.40E-08	K(gEpalm)14, LEAGG, R20 A24
g601	4.93E-13	3.98E-11	7.41E-08	K(gEpalm)14, LEAGG
g816	1.10E-12	3.16E-11	2.00E-08	K(gEpalm)14, LEAGG, E17
g817	1.68E-12	2.51E-11	1.52E-08	K(gEpalm)14, LEAGG, A18
g876	1.04E-11	8.63E-11	7.90E-08	K(gEpalm)14, LEAGG, R20, E24, E12
g805	1.44E-12	2.28E-11	9.97E-08	K(gEpalm)14, LEAGG, R20 E24
g850	2.19E-12	2.12E-11	8.96E-08	K(gEpalm)14, LEA, R20, A24, S18 R12
g836	1.55E-11	1.24E-10	1.00E-07	K(gEpalm)14, LEAGG, R20 E24, E17
g804	1.95E-12	7.15E-11	9.97E-08	K(gEpalm)14, LEA, R20, A24
g618	no hay datos			K(Ahx-palm)20, LEKGR
g781	2.86E-12	1.04E-10	4.02E-07	K(gEpalm)16, LEAGG, R20 A24
g782	1.56E-10	2.54E-11	1.43E-06	K(gEpalm)18, LEAGG, R20 A24

ES 2 698 329 T3

g744	3.92E-11	2.45E-09	0.00E+00	K(gE-palm)20, LEAGG
g746	3.54E-11	1.15E-08	0.00E+00	K(gE-palm)24, LEAGG
g747	9.42E-11	3.16E-09	1.04E-06	K(gE-palm)31, LEAGG
g512	6.06E-11	9.80E-11	4.07E-07	K(gEpalm)17, LEAGG, G2
g513	7.23E-10	1.75E-10	2.98E-07	K(gEpalm)17, LEAGG, E3
g734	8.28E-08	6.95E-11	1.17E-06	K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24, E3 E12
g837	2.13E-10	4.67E-10	1.14E-07	K(gE-palm)17, LEAGG, R20 A24 E12
g838	5.68E-12	2.37E-11	8.43E-08	K(Ahx-palm)17, LEAGG, R20 A24 E12
g783	9.11E-11	4.24E-11	8.46E-07	K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24 E12
g851	no hay datos			K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24, R12 ácido
g852	no hay datos			K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24, R12 Aib2 ácido
g819	2.34E-12	1.80E-11	1.03E-07	K(bA-palm)17, LEAGG, R20 A24
g536	4.78E-12	7.45E-11	0.00E+00	
g600	5.47E-12	6.66E-11	1.24E-07	K(gE-palm)17, LVAGG, E24
g599	9.62E-11	8.76E-11	1.13E-07	K(gE-palm)17, LVAGG, E20

Los péptidos de secuencia original HSQGT5 FTSDY10 SKYLD15 SRRAQ20 DFVQW25 LERGG-amida en esta sección contienen todos ellos la secuencia LERGG desde el residuo 26 en adelante a menos que se indique de otro modo, p. ej., LENT

	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Sitio y naturaleza de la palmitoilación, sustituciones en la secuencia original
	CE50 M	CE50 M	CE50 M	
g825	3.67E-12	1.91E-11	8.67E-08	K(Ahx-palm)17, LENT, R20 E24, E12
g588	7.23E-11	1.10E-10	9.80E-08	K(gEpalm)17, LERGG, G2
g614	3.65E-12	9.31E-12	9.93E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, E12
g684	1.64E-10	1.51E-11	1.46E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2
g721	3.23E-09	4.11E-10	9.79E-07	K(gE-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2
g724	3.09E-08	1.90E-11	9.33E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2 E3
g772	1.84E-10	2.92E-10	1.54E-06	K(gE-palm)17, LERGG, R20 A24 E12
g795	1.10E-10	7.34E-11	5.79E-07	K(bA-palm)17, LERGG, R20 A24 E12
g794	4.69E-12	1.57E-11	3.22E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12
g826	4.23E-12	2.93E-11	5.80E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 ácido
g727	2.18E-10	2.63E-11	1.77E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 A24 E12 G2 ácido
g683	3.72E-10	1.59E-11	1.26E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, A20 A24 E12 G2
g722	1.11E-08	4.26E-10	1.67E-06	K(gE-palm)17, LERGG, A20 A24 E12 G2
g725	5.99E-08	2.52E-11	1.48E-06	K(Ahx-palm)17, LERGG, A20 A24 E12 G2 E3

g818	8.90E-12	2.10E-11	9.40E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, A20 A24 E12
g682	1.95E-10	1.43E-11	1.22E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 E24 E12 G2
g723	8.95E-09	3.30E-10	7.61E-07	K(gE-palm)17, LERGG, R20 E24 E12 G2
g726	1.31E-08	7.91E-12	2.15E-07	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 E24 E12 G2 E3
g771	5.51E-12	1.75E-11	3.71E-08	K(Ahx-palm)17, LERGG, R20 E24 E12
g617	no hay datos			K(Ahx-palm)20, LERGG, G2, E12
g787	4.36E-11	6.65E-09	0.00E+00	K(Ahx-palm)20, LERGG, A24 E17
g806	9.9E-12	1.71E-10	1.05E-07	K(Ahx-palm)21, LERGG, A18
g616	no hay datos			K(Ahx-palm)24, LERGG, G2, E12
g701	3.83E-09	7.4E-09	0.00E+00	K(gEpalm)12, LERGG, G2 E17
Los péptidos de extensión de secuencia original HSQGT5 FTSDY10 SKYLD15 SRRAQ20 DVFQW25 LVAGG en esta sección contienen los residuos denominados C-terminales hasta el residuo 30 y una amida C-terminal				
	hGlucR	hGLP1R	hGIPR	Extensión de la secuencia
	CE50 M	CE50 M	CE50 M	
g316	1.06E-11	3.14E-11	3.65E-09	SSGGSS
g317	0.00E+00	2.63E-09	0.00E+00	SSGGSS K
g318	9.04E-09	1.14E-09	0.00E+00	SSGGSSK(palm)
g402	5.96E-11	8.57E-11	0.00E+00	SGSGSG
g319	1.04E-11	3.61E-11	0.00E+00	PSSGA PPPSK
g320	3.20E-12	9.38E-12	1.01E-09	PSSGA PPPSK(palm)
g315	5.04E-12	2.73E-11	1.97E-08	GGGG
g325	1.03E-11	2.61E-11	0.00E+00	GGGGK
g326	2.82E-12	2.47E-11	1.26E-08	GGGGK(palm)
g327	2.32E-12	1.93E-11	1.28E-08	GGGGK(gEpalm)
g321	2.79E-11	2.72E-11	6.41E-09	KNNRNNIAK
g322	3.55E-12	1.06E-11	1.72E-09	KNNRNNIAK(palm)

Abreviaturas: K(gE-palm) = lisina con un grupo palmitoilo conjugado en el nitrógeno épsilon, mediante un conector de tipo ácido gamma glutámico; K(Ahx-palm) = lisina con un grupo palmitoilo conjugado en el nitrógeno épsilon, mediante un conector de tipo ácido aminohexanoico; K(bA-palm) = lisina con un grupo palmitoilo conjugado en el nitrógeno épsilon, mediante un conector de tipo ácido de beta alanina; Aib, ácido aminoisobutírico; K(palm) = lisina con un grupo palmitoilo conjugado directamente en el nitrógeno épsilon.

Ensayos de producción de cAMP mediada por receptores de glucagón y GLP-1 en presencia de concentraciones en plasma de albúmina de suero (ensayo 2). Las determinaciones de potencia agonista para péptidos que inducen la producción de cAMP se midieron en células CHO que expresaban receptores de glucagón (abreviados como GlucR o GCGR) o receptores de GLP-1 humanos, de rata o ratón en presencia de albúmina de suero humano, de rata o ratón con una concentración de un 4.4, 3.2 y 3.2%, respectivamente.

Se cultivaron células CHO con expresión recombinante estable del receptor de GLP-1 o GlucR humano, de ratón o rata en DMEM con un 10% de FBS y geneticina (100 µg/ml). Se prepararon patrones de células conservadas criológicamente en 1x medio de congelación de células-DMSO exento de suero (Sigma Aldrich) con una densidad de 2×10^7 /vial y se conservaron a -80 °C. Las células se descongelaron rápidamente a 37 °C y a continuación se diluyeron en tampón de ensayo (DMEM) que contenía albúmina de suero con una concentración de un 4.4, 3.2 y 3.2% para

albúmina de suero humano, de rata y ratón, respectivamente. Los péptidos se diluyeron en serie en DMSO y a continuación se diluyeron 100 veces en DMEM que contenía albúmina de suero con la concentración final mencionada. A continuación, los péptidos diluidos se transfirieron a placas de ensayo de microtitulación de 384 pocillos negros poco profundos. Se añadieron las células a las placas de ensayo y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Tras la incubación, se detuvo el ensayo y se midieron los niveles de cAMP utilizando el kit de ensayo HTRF® dinámico d2 para cAMP que se puede adquirir de CisBio Bioassays, siguiendo las directrices del fabricante. La lectura de las placas se llevó a cabo en lectores de placas de fluorescencia Perkin Elmer ENVISION®. La albúmina de suero humano y de rata se adquirió en Sigma Aldrich y la albúmina de suero de ratón se adquirió en Equitech Bio Ltd.

Los datos se transformaron en % de Delta F según se describe en las directrices del fabricante y se analizaron utilizando un ajuste logístico de 4 parámetros para determinar los valores de CE50. En la Tabla 5 se muestran los valores de CE50 del ensayo 2 para los péptidos seleccionados. Los valores de CE50 del ensayo 2 determinados dependen tanto de la potencia intrínseca de los péptidos evaluados en los receptores de GLP-1 y glucagón en las líneas celulares recombinantes como de la afinidad del péptido por la albúmina de suero, que determina la cantidad de péptido libre. La asociación con la albúmina de suero incrementa el valor de CE50 obtenido. La fracción de péptido libre para concentraciones en plasma de albúmina y la CE50 para un 0% de HSA se pueden calcular en función de la variación de la generación de cAMP con la concentración de HSA. Por ejemplo, G730 y G933 presentaron unos valores de un 0.85% y un 0.29% para el péptido libre con un 4.4% de HSA y de 7 pM y 6 pM para la CE50 en el GLP1R con un 0% de HSA, respectivamente. G797 y G849 presentaron unos valores de un 0.82% y un 0.48% para el péptido libre con un 4.4% de HSA y de 7 pM y 2 pM para la CE50 en el GLP1R con un 0% de HSA, respectivamente. Para comparar el equilibrio de actividades en el GLP1R y GlucR entre diferentes péptidos y para diferentes condiciones, estas se pueden correlacionar utilizando el siguiente cálculo, donde los valores de CE50 se refieren a los de los ligandos naturales.

Tabla 5: potencias de CE50 para péptidos agonistas de GLP-1/glucagón en presencia de concentraciones en plasma de albúmina de suero (ensayo 2)

Péptido	Ensayo en un 4.4% de albúmina de suero humano			Ensayo en un 3.2% de albúmina de suero de ratón			Ensayo en un 3.2% de albúmina de suero de rata		
	CE50 para GLP1R humano	CE50 para GlucR humano	Relación GlucR/ GLP1R humano ¹	CE50 para GLP1R de ratón	CE50 para GlucR de ratón	Relación GlucR/ GLP1R de ratón ¹	CE50 para GLP1R de rata	CE50 para GlucR de rata	Relación GlucR/ GLP1R de rata ¹
	pM	pM		pM	pM		pM	pM	
G730	455	402	0.122	1100	5460	0.04	81	45 080	0.06
G797	739	1137	0.07	290	764	0.08	60	23 170	0.08
G849	172	79	0.235	88	103	0.17	44	4055	0.33
G933	943	564	0.179	540	377	0.29	136	15 500	0.27
G865	150	570	0.027	96	1100	0.021	18	87 100	0.01
G796	140	53	0.275	130	34	0.78	23	2000	0.36
G812	316	764	0.044	130	947	0.032	19	14 100	0.04
G380	6543	53 590	0.013	15 000	576 000	0.006			
GLP1	25			21			1.9		
Glucagón		2.7		9700	4.97		557	60	

¹Las relaciones de GlucR/GLP1R se determinaron como se indica a continuación:

Potencia relativa de GlucR = CE50 para el glucagón / CE50 para el péptido evaluado

Potencia relativa de GLP1R = CE50 para GLP1 / CE50 para el péptido evaluado

Relación de GlucR/GLP1R = potencia relativa de GlucR / potencia relativa de GLP1R

Evaluación de la estabilidad de los péptidos en plasma. Se determinó la estabilidad en plasma de los péptidos G730, G797, G849 y G933 como se indica a continuación.

Se prepararon soluciones patrón de los péptidos de aproximadamente 200 µmol/l pesando el péptido sólido en un tubo eppendorf de baja unión y disolviéndolo en DMSO. Se añadieron 10 µl de las soluciones patrón a 990 µl de plasma en un tubo eppendorf de baja unión, lo cual dio como resultado unas concentraciones iniciales de los péptidos en plasma de aproximadamente 2 µmol/l. El plasma congelado utilizado como blanco de ser humano, rata y ratón se descongeló y se calentó hasta una temperatura de 37 °C antes de añadir la solución patrón. Las muestras de plasma añadidas se mezclaron suavemente y se permitió que se equilibraran durante aproximadamente 5 minutos antes de empezar el experimento. Las muestras de plasma se incubaron durante 48 horas en una incubadora de CO₂ GalaxyR a 37 °C. La toma de muestras (30µl) se llevó a cabo a las 0, 1, 2, 6.5, 17, 24 y 48 horas. Las muestras se conservaron a -70 °C hasta el análisis.

Las muestras de plasma se analizaron como se indica a continuación. Se hicieron precipitar las proteínas de las muestras de plasma de 30 µl con 180 ml de etanol frío en una placa de baja unión de 96 pocillos (Eppendorf Protein LoBind). Después de mezclar y centrifugar, se transfirieron 100 µl de sobrenadante a una placa nueva y se inyectó 1 µl en una columna analítica.

El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema µLC (LC Exigent µLC) acoplado a un espectrómetro de masas de resolución media-alta (Perkin Elmer PenTOF) con ionización por electronebulización positiva. La columna analítica fue una columna C18 Agilent Poroshell (hecha a medida) de 5 cm, 1 mm con un tamaño de partícula de 2.7 µm. Flujo: 0.1 ml/min utilizando un gradiente lento de fase inversa. Las fases móviles utilizadas fueron acetonitrilo y agua con un 0.1% de ácido fórmico.

Los datos resultantes se evaluaron manualmente para determinar los siguientes productos de degradación: producto +1 (ácido) y el producto de escisión de la DPP IV. Los productos con masa +1 se pueden originar a partir de la desamidación en los grupos amida de la glutamina o en el extremo C. Los productos de escisión se originan a partir de la acción de la proteasa DPP IV en plasma. Tanto la degradación de los péptidos como la formación de productos peptídicos se registraron como un porcentaje de la concentración de péptido inicial. Se integraron los picos y se calculó el % de péptido remanente: (área del pico/área del pico 0H)*100. En la Tabla 6 se muestran los datos para el punto de evaluación de 24 h. Los niveles de desamidación y escisión de la DPP IV fueron bajos para G797 y G933.

Tabla 6: estabilidad de los péptidos en plasma

Péptido	Estabilidad plasmática en plasma de ratón a las 24 h			Estabilidad plasmática en plasma humano a las 24 h			Estabilidad plasmática en plasma de rata a las 24 h		
	% de péptido estable	% de prod. +1	% de producto escindido por DPP/+1 producto escindido por DPP	% de péptido estable	% de prod. +1	% de producto escindido por DPP/+1 producto escindido por DPP	% de péptido estable	% de prod. +1	% de producto escindido por DPP/+1 producto escindido por DPP
G730	65	15	14 / 5	100	< 1	< 1	24	58	2
G797	84	< 1	1	85	< 1	< 1	60	< 1	1
G849	38	< 1	22	100	< 1	< 1	69	16	3
G933	83		1	86		< 1	85		< 1

Solubilidad. Se evaluó la solubilidad de los péptidos en varias especies tampón dentro de un intervalo de pH de 4.5 a 8.0, según se indica a continuación. Se reconstituyeron formas en polvo secas de los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón en varios tampones a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 280 nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 y se calculó la concentración del péptido utilizando la siguiente ecuación:

$$c=(A_{280} \cdot M_w)/\epsilon$$

donde: c- concentración ε- coeficiente de extinción

M_w- peso molecular A₂₈₀- absorbancia a 280 nm

$$\epsilon = (1 \times \text{Trp} = 5560) + (1 \times \text{Tyr} = 1200)$$

Los resultados se muestran en la Tabla 7. Cada uno de los péptidos fue soluble para una concentración de 0.8 mg/ml en un intervalo de pH (de 6.5 a 8.5). G730 fue soluble en un intervalo de pH de 4.5 a 8.0, G797 fue soluble en un

intervalo de pH de 6 a 8.0 y G933 fue soluble en un intervalo de pH de 6 a 8.0. La solubilidad de G933 se evaluó en una serie de sistemas tampón diferentes, que también se muestran en la Tabla 7. G933 fue soluble para una concentración de 1 mg/ml en al menos los siguientes sistemas tampón: histidina (pH 6 y 7; fuerza iónica: de 0.25 a 100 mM), fosfato de sodio (pH 6-7.5; fuerza iónica: de 0.25 a 100 mM) y tris/hidroximetilaminometano (pH 7-9; fuerza iónica: de 0.25 a 100 mM).

Tabla 7: perfil de solubilidad de los péptidos (fuerza iónica de todos los tampones: 100 mM)

Tampón	Conc. (mg/ml)			
	A280			
	Diana 1 mg/ml			
	G730	G797	G849	G933
Glutamato, pH 4.5	0.83	0.023	NA	0.02
Acetato, pH 5	NA	NA	NA	0.03
Succinato, pH 5	NA	NA	NA	1.1
Fosfato, pH 6	0.14	0.84	0.06	1.2
Histidina, pH 6	NA	NA	NA	1.2
Fosfato, pH 6.5	0.83	0.84	NA	NA
Fosfato, pH 7.0	NA	NA	NA	1.1
Histidina, pH 7.0	NA	NA	NA	1.1
Fosfato, pH 7.5	0.85	0.86	NA	1.2
Tris, pH 7.5	0.83	0.89	0.89	1.2
Tris, pH 8.0	1.1	0.83	0.89	1.2

Formulaciones. Se evaluó la solubilidad de los péptidos en tres formulaciones isotónicas diferentes:

1. Formulación por defecto (DF) = Tris 0.1 M de pH 7.5, manitol 150 mM. pH de la formulación final = 7.2.
2. Formulación de reserva 1 (BF1) = Tris 0.05 M, arginina/prolina 50 mM. pH de la formulación final = 8.0.
3. Formulación de reserva 2 (BF2) = tampón de fosfato sódico (pH 8)/1.85% p/v de propilenglicol. pH de la formulación final = 7.0.

Se midió la solubilidad como se ha detallado anteriormente y los resultados se muestran en la Tabla 8. G730, G797 y G933 fueron solubles hasta una concentración de al menos 5 mg/ml en DF, la solubilidad máxima de G849 en DF fue de 3.7 mg/ml, G797 fue soluble hasta una concentración de al menos 10 mg/ml en BF1 y G933 fue soluble hasta una concentración de al menos 10 mg/ml en BF2.

Tabla 8: solubilidad de los péptidos en la formulación

Candidato principal	Concentración de la formulación	Formulación	Solubilidad para 10 mg/ml (BF2)
G730	5 mg/ml	DF	No
G797	5 mg/ml	DF/BF1	Sí
G849	3.7 mg/ml	DF	n/a
G933	5 mg/ml	DF	sí

Concentración determinada por A280nm

La estabilidad de la DF se evaluó midiendo la pureza por cromatografía líquida de ultrarresolución de fase inversa (RP

UPLC), dentro de un periodo de un mes. Las condiciones de almacenamiento fueron de 5 °C, 25 °C, 40 °C y -80 °C. Los resultados se muestran en las Tablas 9 y 10.

**Tabla 9: pureza de la formulación del péptido
después de 1 mes en condiciones de estabilidad**

Péptido	5 °C	25 °C	40 °C	menos 80 °C
G730_DF	97.7	96.1	86.1	97.7
G797_BF1	98.72	98.84	77.54	NA
G849_DF	95.5	NA	NA	NA
G933_DF	97.8	95.9	88.9	98.9

**Tabla 10: pérdida de pureza de la formulación del péptido (% en comparación con T0) después de 1 mes
en condiciones de estabilidad**

Candidato principal	5 °C	25 °C	40 °C	menos 80 °C
G730_DF	0.82	2.43	12.54	0.3
G797_BF1	0.24	0.12	21.65	0.3
G849_DF	n/a	n/a	n/a	n/a
G933_DF	0.3	2.2	9.3	(-)0.8

Todos los péptidos mostraron unas propiedades aceptables respecto a la solubilidad, formulabilidad y estabilidad.

Ejemplo 3: estudios *in vivo*

G730, G797 y G812 (estudio A). Se evaluaron péptidos agonistas de GLP-1/glucagón seleccionados descritos en la presente en un modelo de ratón de obesidad inducida por la dieta (DIO, por sus siglas en inglés), como se indica a continuación. Hembras C57/Bl6JHsdOla (obtenidas de Harlan Laboratories, Reino Unido) iniciaron una dieta rica en grasas de D12492 (Research Diets, NJ, EE. UU.) y un dulce de chocolate, una bola de Delicato (Delicata Bakverk, Suecia) a las 9-11 semanas de edad y se mantuvieron en la dieta durante 16 semanas antes de llegar a las instalaciones animales, durante un periodo de aclimatación de tres semanas y durante el tratamiento farmacológico, el contenido calórico de los dos componentes de la dieta se muestra en la Tabla 11. Los ratones se dividieron en 9 grupos (n=5-6) y el tratamiento se inició a las 29 semanas de edad. Los grupos de tratamiento y la dosificación se muestran en la Tabla 12.

Tabla 11: contenido de la dieta DIO

Producto	Proteína (%)	Carbo-hidrato (%)	Grasa (%)	Kcal de grasa (%)	Kcal totales/ gramo
Bola de Delicato (Delicata Bakverk AB, Huddinge, Suecia)	5	53	31	54	5.05
D12492 (Research Diets, NJ, EE. UU.)	26.2	26.3	34.9	60	5.24

Tabla 12: grupos de tratamiento para el estudio A

Péptido	Dosis	N.º de animales
Vehículo	NA	6
Liraglutida	26.6 nmol/kg	6
G730	10 nmol/kg	6
G730	20 nmol/kg	5
G730	50 nmol/kg	6
G797	5 nmol/kg	5
G797	20 nmol/kg	6
G797	50 nmol/kg	6
G812	20 nmol/kg	5

5 Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón G730, G797 y G812, así como también la Liraglutida, se formularon en el vehículo, Tris 100 mM/manitol 150 mM, pH 7.4. Los tratamientos se administraron por vía subcutánea dos veces al día durante 14 días, a la vez que se mantenía a los animales en una dieta rica en grasas. El peso corporal de los animales se monitorizó a diario a lo largo del periodo de dosificación. El día 14 se tomaron muestras de sangre para medir la glucosa e insulina en plasma a partir de ratones conscientes después de un periodo de ayuno de 4 horas. A continuación, los ratones se anestesiaron utilizando isoflurano y se recolectó sangre terminal a partir del lecho capilar tras el ojo. Se midieron los siguientes parámetros: medidas químicas en sangre de triglicéridos, colesterol total, ácidos grasos no esterificados (NEFA, por sus siglas en inglés), beta-hidroxibutirato y factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) (Tablas 14 y 15 a continuación).

10 En las FIG. 1-4 se muestra el efecto del tratamiento con liraglutida y los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón G730, G797 y G812 sobre el peso corporal, en comparación con la liraglutida y el vehículo. Los animales tratados con G730 o G797 mostraron una dependencia de la dosis y una pérdida de peso continua durante el periodo de dosificación de 14 días. Para 50 nmol/kg, los animales tratados con G730 y G797 experimentaron un cambio de aproximadamente un 24% en su peso el día 14 en comparación con los animales tratados con vehículo.

15 Los ratones tratados con G730 o G797 mostraron una reducción dependiente de la dosis en los niveles de glucosa el día 14 (Tabla 13). También se observó una reducción de los niveles de insulina, con estos dos tratamientos, especialmente para las dosis más elevadas (Tabla 13). La evaluación del modelo homeostático acerca del índice de sensibilidad a la insulina (HOMA, por sus siglas en inglés) mejoró significativamente para 20 nmol/kg de G730 y 20 y 50 nmol/kg de G797. HOMA es un método de modelización que utiliza la suma de los niveles de insulina y glucosa en plasma para evaluar la función de las células β y la resistencia a la insulina (Tabla 14). El colesterol en plasma total se redujo tanto con liraglutida como con G730 y G797 para todas las dosis, con unos cambios menos pronunciados en los niveles de ácidos grasos no esterificados (NEFA) en plasma y en los triglicéridos (TG) hepáticos y en plasma. El beta-hidroxibutirato (BeHy) mostró tendencias hacia niveles mayores, acorde con la pérdida de peso corporal. El factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) se incrementó en general con el tratamiento del péptido agonista de GLP-1/glucagón dual.

Tabla 13: efecto del tratamiento con el péptido agonista de GLP-1/glucagón sobre la glucosa, insulina y HOMA

Péptido	Dosis (nmol/kg)	PC inicial (g)	SEM	PC el día 14 (% de cambio respecto a la media del vehículo)	SEM	Glucosa (mM)	SEM	Insulina (nM)	SEM	HOMA	SEM
Vehículo	0	47.4 ± 3.7		0.0 ± 0		8.8 ± 0.6		0.8 ± 0.23		7.2 ± 2.0	
Lira-glutida	27	47.5 ± 1.8		-13.3 ± 1.4		8.0 ± 0.2		0.3 ± 0.12		2.8 ± 1.1	
G730	10	44.5 ± 2.2		-7.5 ± 1.1		7.2 ± 0.3	*	0.4 ± 0.14		3.3 ± 1.1	
G730	20	45.9 ± 3.6		-15.6 ± 2.2		6.7 ± 0.6	*	0.2 ± 0.06		1.7 ± 0.5	*
G730	50	46.1 ± 2.4		-24.0 ± 5.1		5.9 ± 0.7	*	0.3 ± 0.13		2.1 ± 1.0	
G797	5	47.5 ± 1.2		-5.7 ± 3.2		7.5 ± 0.3		0.7 ± 0.25		5.3 ± 2.0	
G797	20	47.4 ± 2.2		-16.0 ± 4.4		7.1 ± 0.6		0.3 ± 0.09		2.0 ± 0.8	*
G797	50	47.2 ± 1.8		-25.4 ± 2.0		6.6 ± 0.5	*	0.1 ± 0.01	*	0.6 ± 0.1	*
G812	20	49.2 ± 3.4		-8.7 ± 1.4		8.0 ± 0.4		0.7 ± 0.23		6.0 ± 2.1	

Resultados evaluados mediante una prueba t de varianza desigual de dos muestras con distribución de dos colas;

* indica $p < 0.05$ en comparación con el vehículo.

Tabla 14: efecto del tratamiento con el péptido agonista de GLP-1/glucagón sobre medidas químicas en sangre adicionales

Péptido	Dosis (nmol/kg)	TG hepáticos (g de TG/100 g de tejido)	SEM	TG en plasma (nM)	SEM	NEFA en plasma (nM)	SEM	Colesterol en plasma (nM)	SEM	BeHy (μmol/l)	SEM	FGF2 ₁ (pg/ml)	SEM
Vehículo	0	13.6 ± 0.5	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01	4.65 ± 0.12	389 ± 46	2757 ± 317						
Lira-glutida	27	13.1 ± 2.1	0.24 ± 0.01	0.24 ± 0.01	3.75 ± 0.16 *	345 ± 21	2481 ± 650						
G730	10	9.0 ± 0.9	0.21 ± 0.02	0.28 ± 0.02	3.10 ± 0.16 *	428 ± 54	1963 ± 219						
G730	20	17.7 ± 3.4	0.20 ± 0.03	0.26 ± 0.03	2.45 ± 0.30 *	750 ± 318	2236 ± 300						
G730	50	28.1 ± 10.1	0.23 ± 0.03	0.32 ± 0.05	2.19 ± 0.23 *	1477 ± 479	5294 ± 2307						
G797	5	13.0 ± 1.1	0.16 ± 0.02	0.24 ± 0.03	3.32 ± 0.38 *	392 ± 111	2362 ± 342						
G797	20	17.7 ± 5.7	0.14 ± 0.02	0.27 ± 0.05	2.44 ± 0.27 *	659 ± 240	7277 ± 2455						
G797	50	15.6 ± 5.8	0.12 ± 0.02	0.24 ± 0.02	1.85 ± 0.07 *	1257 ± 285	5373 ± 813 *						
G812	20	7.9 ± 0.6	0.13 ± 0.01	0.21 ± 0.01	2.79 ± 0.24 *	333 ± 63	3207 ± 388						

Resultados evaluados mediante una prueba t de varianza desigual de dos muestras con distribución de dos colas;

* indica $p < 0.05$ en comparación con el vehículo.

G865, G933 y G796 (estudio B). Se evaluó un conjunto adicional de péptidos de GLP-1/glucagón en un modelo de obesidad inducida por la dieta utilizando el mismo protocolo anterior, pero con los grupos de tratamiento y la dosificación que se muestran en la Tabla 15:

Tabla 15: grupos de tratamiento para el estudio B

Péptido	Dosis	N.º de animales
Vehículo	NA	6
Liraglutida	26.6 nmol/kg	6
G865	5 nmol/kg	6
G865	10 nmol/kg	6
G933	5 nmol/kg	6
G933	10 nmol/kg	6
G796	20 nmol/kg	6
G796	50 nmol/kg	6

5 Los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón G865, G933 y G796, así como también la liraglutida, se formularon en el vehículo, Tris 100 mM/manitol 150 mM, pH 7.4. Los tratamientos se administraron por vía subcutánea dos veces al día durante 14 días, a la vez que se mantenía a los animales en una dieta rica en grasas. El peso corporal de los animales se monitorizó a diario a lo largo del periodo de dosificación. El día 14 se tomaron muestras de sangre para medir la glucosa e insulina en plasma a partir de ratones conscientes después de un periodo de ayuno de 4 horas. A
10 continuación, los ratones se anestesiaron utilizando isoflurano y se recolectó sangre terminal a partir del lecho capilar tras el ojo. Se midieron los siguientes parámetros: medidas químicas en sangre de triglicéridos, colesterol total, ácidos grasos no esterificados (NEFA), beta-hidroxibutirato y factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) (Tabla 16 y Tabla 17 a continuación).

15 En las FIG. 5-8 se muestra el efecto del tratamiento con liraglutida y los péptidos agonistas de GLP-1/glucagón G933, G865 y G796 sobre el peso corporal, en comparación con la liraglutida y el vehículo. Los animales tratados con G933, G865 o G796 mostraron una dependencia de la dosis y una pérdida de peso continua durante el periodo de dosificación de 14 días.

20 En la Tabla 16 se muestran los niveles de glucosa, niveles de insulina y HOMA el día 14 después del tratamiento. En la Tabla 17 se muestran los niveles de colesterol en plasma total, niveles de ácidos grasos no esterificados en plasma (NEFA), niveles de triglicéridos (TG) hepáticos y en plasma, niveles de beta-hidroxibutirato (BeHy) y niveles del factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21) el día 14 después del tratamiento.

Tabla 16: efecto del tratamiento con el péptido agonista de GLP-1/glucagón sobre la glucosa, insulina y HOMA

Péptido	Dosis (nmol/kg)	PC inicial (g)	SEM	PC el día 14 (% de cambio respecto a la media del vehículo)	SEM	Glucosa (mM)	SEM	Insulina (nM)	SEM	HOMA	SEM
Vehículo	0	46.9 ± 1	0	0	0	8.7 ± 0.8	0.8	0.58 ± 0.09	0.09	5.05 ± 0.8	0.8
Lira-glutida	27	46.3 ± 1.7	-14	2.1	0.7	7.7 ± 0.7	0.7	0.31 ± 0.07	0.07	2.51 ± 0.7	0.7
G865	5	46.9 ± 0.8	-4	0.1	0.6	6.2 ± 0.6	0.6	0.33 ± 0.08	0.08	2.14 ± 0.6	0.6
G865	10	47.0 ± 0.9	-14	3.4	0.5	6.6 ± 0.5	0.5	0.36 ± 0.06	0.06	2.43 ± 0.5	0.5
G933	5	48.1 ± 1.6	-11	2.7	0.8	6.2 ± 0.8	0.8	0.53 ± 0.13	0.13	3.31 ± 0.8	0.8
G933	10	48.6 ± 0.5	-19	3.5	0.6	7.2 ± 0.6	0.6	0.27 ± 0.07	0.07	1.98 ± 0.6	0.6
G796	20	50.9 ± 1.3	-16	0.6	0.2	6.1 ± 0.2	0.2	0.38 ± 0.05	0.05	2.24 ± 0.2	0.2
G796	50	49.7 ± 0.8	-23	1.6	1.1	6.4 ± 1.1	1.1	0.43 ± 0.14	0.14	2.87 ± 1.1	1.1

Resultados evaluados mediante una prueba t de varianza desigual de dos muestras con distribución de dos colas;

* indica p < 0.05 en comparación con el vehículo.

Tabla 17: efecto del tratamiento con el péptido agonista de GLP-1/glucagón sobre medidas químicas en sangre adicionales

Péptido	Dosis (nmol/kg)	TG hepáticos (g de TG/100 g de tejido)	SEM	TG en plasma (nM)	SEM	NEFA en plasma (mM)	SEM	Colesterol en plasma (mM)	SEM	BeHy (µmol/l)	SEM	FGF2 ₁ (pg/ml)	SEM
Vehículo	0	17.53 ± 1.30	0.25 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.28 ± 0.03	4.56 ± 0.33	0.33 ± 0.03	387.52 ± 87.4	87.4 ± 0.33	2002 ± 174	2002 ± 174		
Lira-glutida	27	18.4 ± 2.5	0.28 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	3.26 ± 0.02	0.02 ± 0.02	572.25 ± 82.4	82.4 ± 0.02	2990 ± 729	2990 ± 729		
G865	5	20.7 ± 5.6	0.26 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.03	3.06 ± 0.05	0.05 ± 0.05	775.06 ± 295.5	295.5 ± 0.05	8151 ± 4788	8151 ± 4788		
G865	10	22.3 ± 5.1	0.23 ± 0.02	0.27 ± 0.02	0.27 ± 0.02	2.89 ± 0.03	0.03 ± 0.03	567.46 ± 169.3	169.3 ± 0.03	5953 ± 3409	5953 ± 3409		
G933	5	11.3 ± 0.8	0.19 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.28 ± 0.01	2.88 ± 0.03	0.03 ± 0.03	673.08 ± 117.2	117.2 ± 0.03	2682 ± 248	2682 ± 248		
G933	10	14.7 ± 4.1	0.16 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.27 ± 0.01	2.32 ± 0.03	0.03 ± 0.03	693.56 ± 158.3	158.3 ± 0.03	4459 ± 1249	4459 ± 1249		
G796	20	9.6 ± 0.9	0.26 ± 0.05	0.24 ± 0.05	0.24 ± 0.05	2.11 ± 0.02	0.02 ± 0.02	360.49 ± 51.1	51.1 ± 0.02	6441 ± 1784	6441 ± 1784		
G796	50	9.9 ± 0.6	0.16 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	1.91 ± 0.02	0.02 ± 0.02	451.80 ± 63.4	63.4 ± 0.02	9830 ± 3278	9830 ± 3278		

Resultados evaluados mediante una prueba t de varianza desigual de dos muestras con distribución de dos colas;

* indica p < 0.05 en comparación con el vehículo.

ES 2 698 329 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Medimmune Limited
<120> AGONISTAS DE GLUCAGÓN/GLP-1 PARA EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD
<130> GLPGG-100W01
<140> Por asignar
<141> 10-12-2013
<150> 61/735.823
<151> 11-12-2012
<160> 26
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

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

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

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<210> 3
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

ES 2 698 329 T3

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

<210> 4
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es Gly o Ser

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es Tyr o Lys

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (12)..(12)
<223> Xaa es Lys, Glu, Arg o Ser

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (13)..(13)
<223> Xaa es Lys o Tyr

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

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es Ser o Gly

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (17)..(17)
<223> Xaa es Glu, Arg, Gln o Lys

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (18)..(18)
<223> Xaa es Arg, Ser o Ala

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (20)..(20)
<223> Xaa es Arg, Lys o Gln

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (21)..(21)
 <223> Xaa es Asp o Glu

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa es Val o Ile

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (24)..(24)
 <223> Xaa es Ala o Gln

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (27)..(27)
 <223> Xaa es Glu o Val

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (28)..(28)
 <223> Xaa es Ala o Lys

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (30)..(30)
 <223> Xaa es Gly o Arg

<400> 4

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

Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Xaa Xaa Trp Leu Xaa Xaa Gly Xaa
 20 25 30

<210> 5
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa es Tyr o Lys

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)

ES 2 698 329 T3

<223> Xaa es Lys, Glu, Arg o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es Lys o Tyr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (17)..(17)

<223> Xaa es Glu, Arg, Gln o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (18)..(18)

<223> Xaa es Arg, Ser o Ala

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es Glu o Val

<400> 5

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

Xaa	Xaa	Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Xaa	Ala	Gly	Gly
			20					25					30

<210> 6

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es Tyr o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Lys, Glu, Arg o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es Lys o Tyr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

ES 2 698 329 T3

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es Glu o Val

<400> 6

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 7

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es Tyr o Lys

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Lys, Glu, Arg o Ser

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (13)..(13)

<223> Xaa es Lys o Tyr

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (27)..(27)

<223> Xaa es Glu o Val

<400> 7

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Xaa Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 698 329 T3

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 8

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 9

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 9

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 10

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Lys, Glu o Arg

<400> 10

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 11

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 698 329 T3

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (12)..(12)

<223> Xaa es Lys, Glu, Arg o Ser

<400> 11

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 12

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 12

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 13

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 13

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 14

<211> 30

ES 2 698 329 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 14

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 15

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 15

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 16

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 16

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
 20 25 30

<210> 17

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 698 329 T3

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 17

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 18

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 18

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 19

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 19

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 20

<211> 30

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 20

ES 2 698 329 T3

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 21
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 21

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

Arg Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 22
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 22

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

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

<210> 23
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> péptido de GLP-1/glucagón quimérico

<400> 23

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

ES 2 698 329 T3

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

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

<220>
<223> G931

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (13)..(13)
<223> Xaa es K(gE-palm)

<400> 24

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

Glu Arg Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Val Ala Gly Gly
20 25 30

<210> 25
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> G934

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (10)..(10)
<223> Xaa es K(gE-palm)

<400> 25

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

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

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 698 329 T3

<223> G973

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (10)..(10)

<223> Xaa es K(gE-palm)

<400> 26

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

Arg Ser Ala Arg Asp Phe Val Ala Trp Leu Glu Ala Gly Gly
 20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos:
 HX2QGTFSTDX10SXI2X13LX15X16X17X18AX20X21FX23X24WLX27X28GX30; donde X2 es G o S, X10 es Y o K, X12 es K, E, R o S, X13 es K o Y, X15 es D o E, X16 es S o G, X17 es E, R, Q o K, X18 es R, S o A, X20 es R, K o Q, X21 es D o E, X23 es V o I, X24 es A o Q, X27 es E o V, X28 es A o K y X30 es G o R (SEQ ID NO:4), donde el residuo de lisina en X10 se modifica por adición de un resto palmitoílo en el grupo N(épsilon) de un residuo de lisina, donde el péptido se une a un receptor de glucagón, se une a un receptor de GLP-1 o se une tanto a un receptor de glucagón como de GLP-1.
2. El péptido de la reivindicación 1, donde X2 es S, X15 es D, X16 es S, X20 es R, X21 es D, X23 es V, X24 es A, X28 es A y X30 es G (SEQ ID NO:5).
3. El péptido de la reivindicación 2, donde si X17 es E, entonces X18 es R y, si X17 es R, entonces X18 es S (SEQ ID NOs:6 y 7).
4. El péptido de la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde X13 es Y y X27 es E (SEQ ID NOs:10 y 11), opcionalmente donde X12 es E (SEQ ID NOs:12 y 13), opcionalmente que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:17 o SEQ ID NO:19, o donde X12 es R (SEQ ID NOs:14 y 15), opcionalmente que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:18.
5. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el grupo carboxilo de X30 esta amidado o es el ácido no modificado.
6. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además una modificación en un aminoácido, opcionalmente donde la modificación consiste en la adición de un resto acilo y/o donde la modificación es un resto palmitoílo en el grupo N(épsilon) de un residuo de lisina, opcionalmente donde el grupo palmitoílo está unido a la lisina mediante un conector opcionalmente donde el conector es gamma glutamato.
7. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el péptido es un ácido HSQGTFTSDK(gammaE-palmitoílo)SEYLDSEARDFVAVKEAGG.
8. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el receptor de glucagón es un receptor de glucagón de ratón o un receptor de glucagón humano se une a un receptor de glucagón humano con una CE50 en el ensayo 1 de cAMP inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM,
 o donde el receptor de GLP-1 es un receptor de GLP-1 de ratón o un receptor de GLP-1 humano opcionalmente donde el péptido se une a un receptor de GLP-1 humano con una CE50 en el ensayo 1 de cAMP inferior a 10 000 pM, inferior a 5000 pM, inferior a 2500 pM, inferior a 1000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM, inferior a 100 pM, inferior a 50 pM, inferior a 25 pM, inferior a 20 pM, inferior a 15 pM, inferior a 10 pM, inferior a 5 pM, inferior a 4 pM, inferior a 3 pM o inferior a 2 pM.
9. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, el cual es un agonista de la actividad de GLP-1, un agonista de la actividad del glucagón o un agonista de tanto la actividad de GLP-1 como del glucagón.
10. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, el cual se une tanto a un receptor de glucagón como a un receptor de GLP-1, donde el péptido exhibe una actividad al menos 2 veces, 5 veces o 10 veces mayor respecto al ligando natural en el receptor de GLP-1 que en el receptor de glucagón.
11. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además un resto heterólogo asociado con el péptido opcionalmente donde el resto heterólogo es una proteína, un péptido, un dominio proteico, un conector, un polímero orgánico, un polímero inorgánico, un polietilenglicol (PEG), biotina, una albúmina, una albúmina de suero humano (HSA), una porción de la unión de FcRn a HSA, un anticuerpo, un dominio de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo de dominio, un dominio de unión a albúmina, una enzima, un ligando, un receptor, un péptido de unión, una estructura que no sea FnIII, un marcador epitópico, un polímero que sea un polipéptido recombinante, una citocina o una combinación de dos o más de los restos mencionados.
12. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 y un portador.
13. Un kit que comprende la composición de la reivindicación 12.
14. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición de la reivindicación 12 para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección provocada o caracterizada por un exceso de peso corporal, opcionalmente donde la enfermedad o afección es la obesidad o es la diabetes de tipo 2, opcionalmente donde el

péptido se administra por inyección, opcionalmente donde la inyección se administra por vía subcutánea, opcionalmente donde el péptido se administra una vez al día, opcionalmente donde el sujeto es un ser humano.

15. El péptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición de la reivindicación 12 para su uso en un método para reducir el peso corporal en un sujeto.

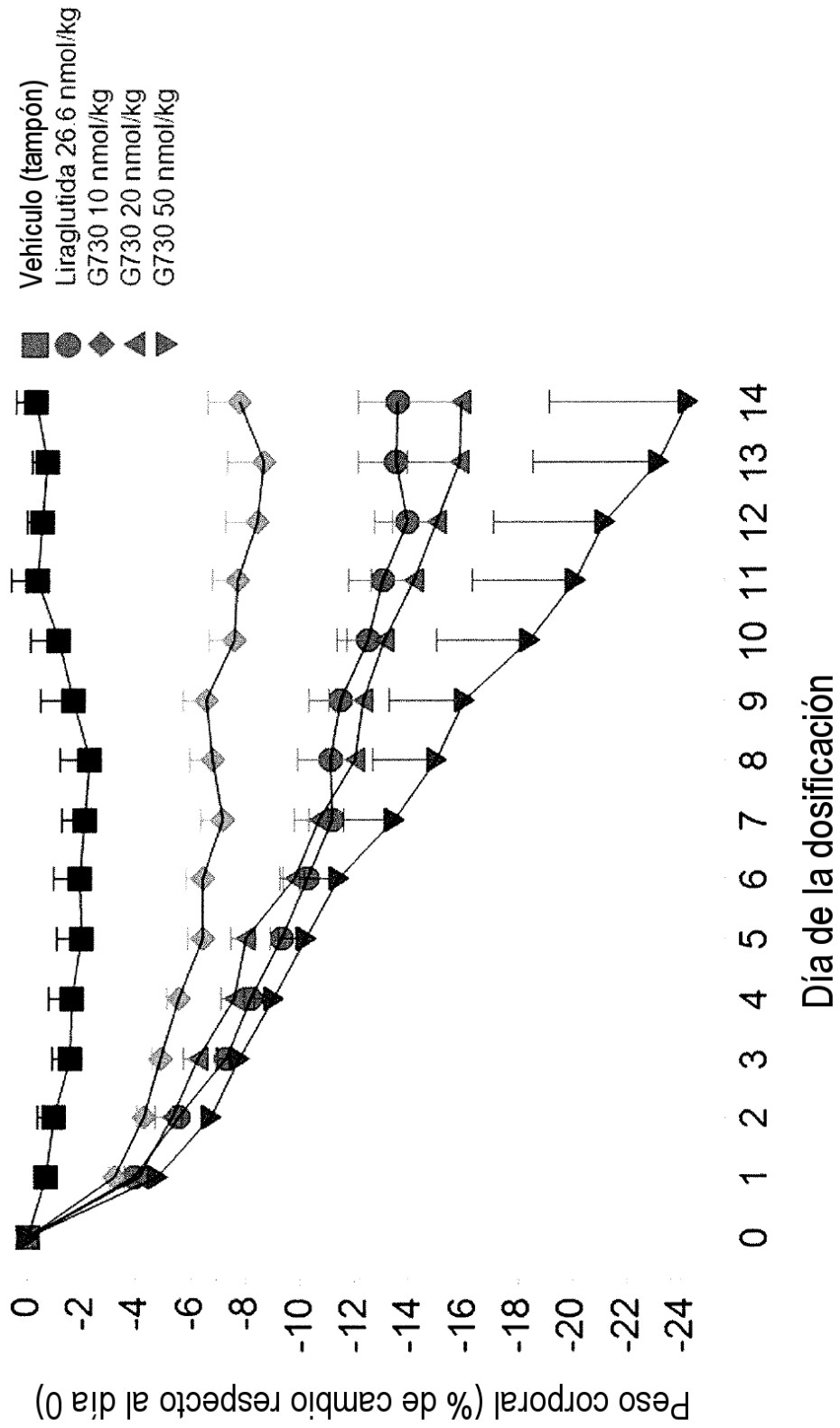


FIG. 1

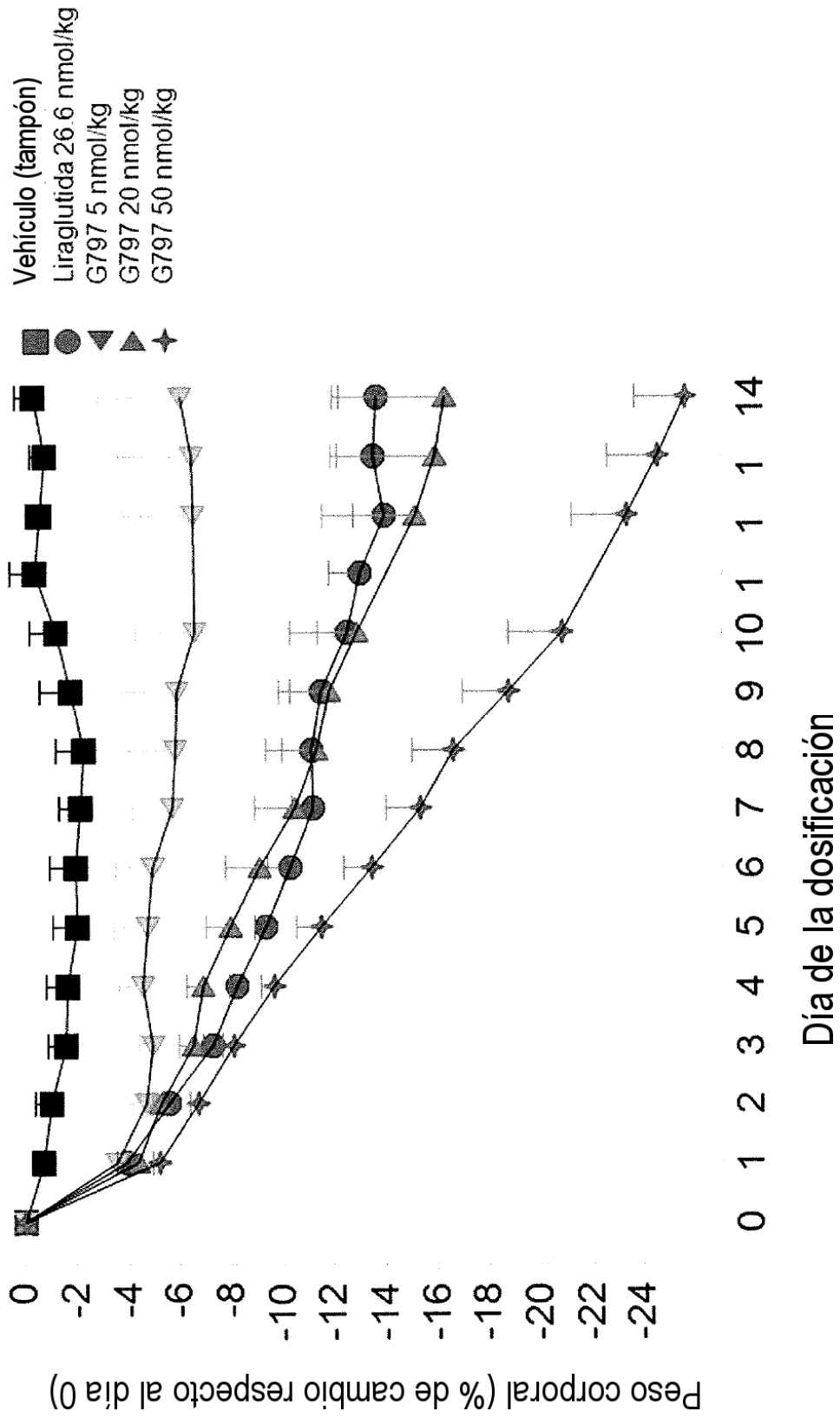


FIG. 2

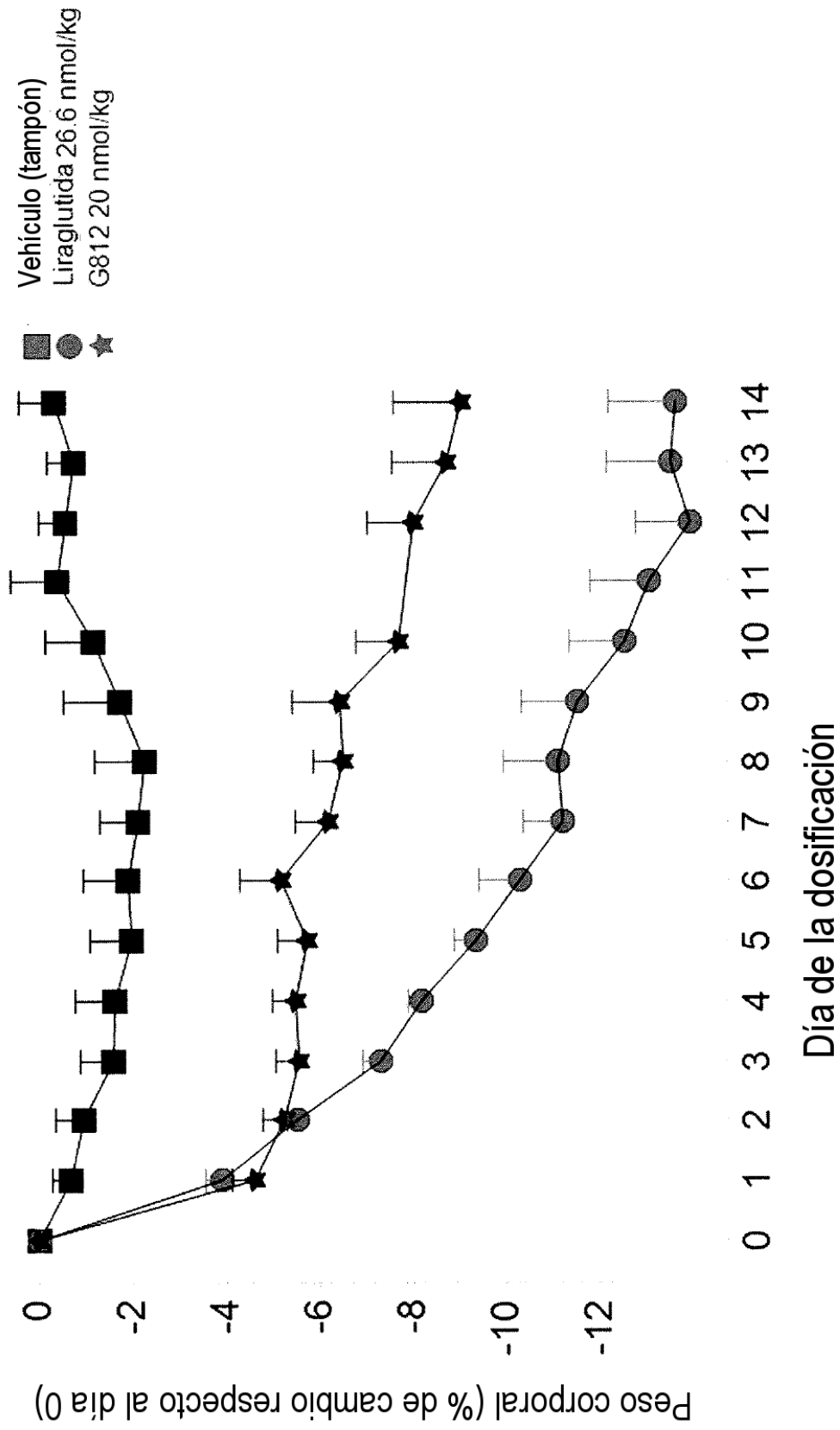


FIG. 3

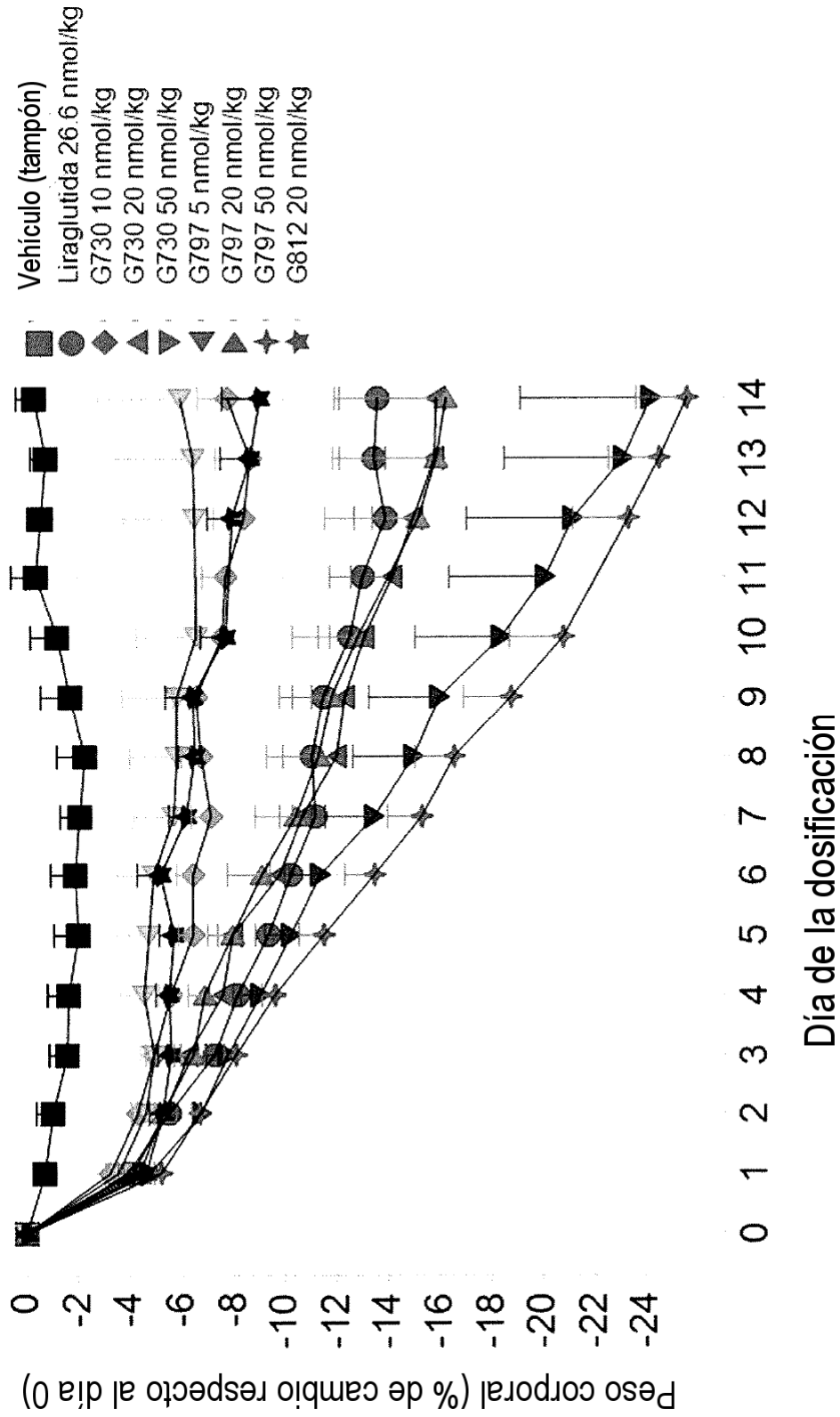


FIG. 4

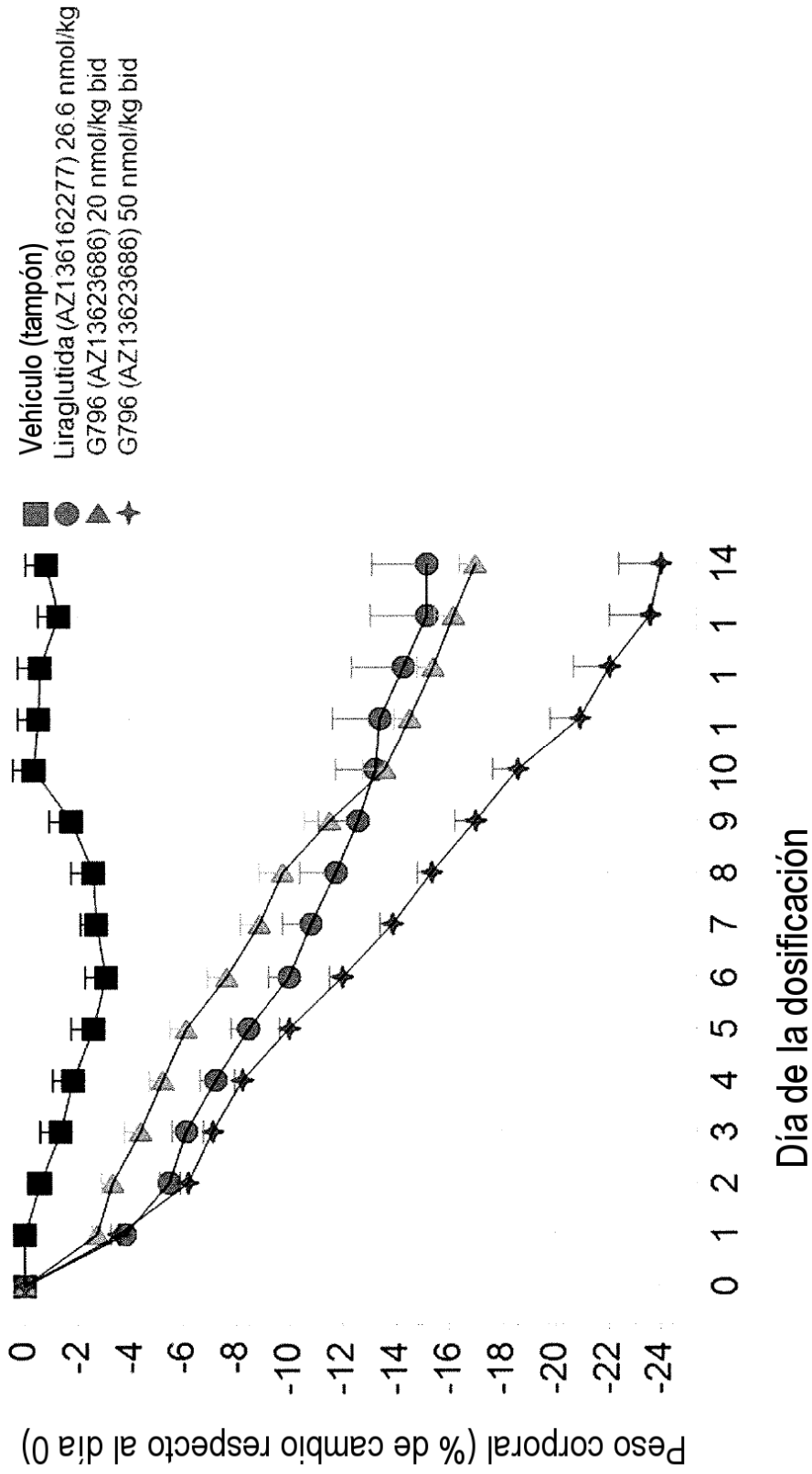


FIG. 5

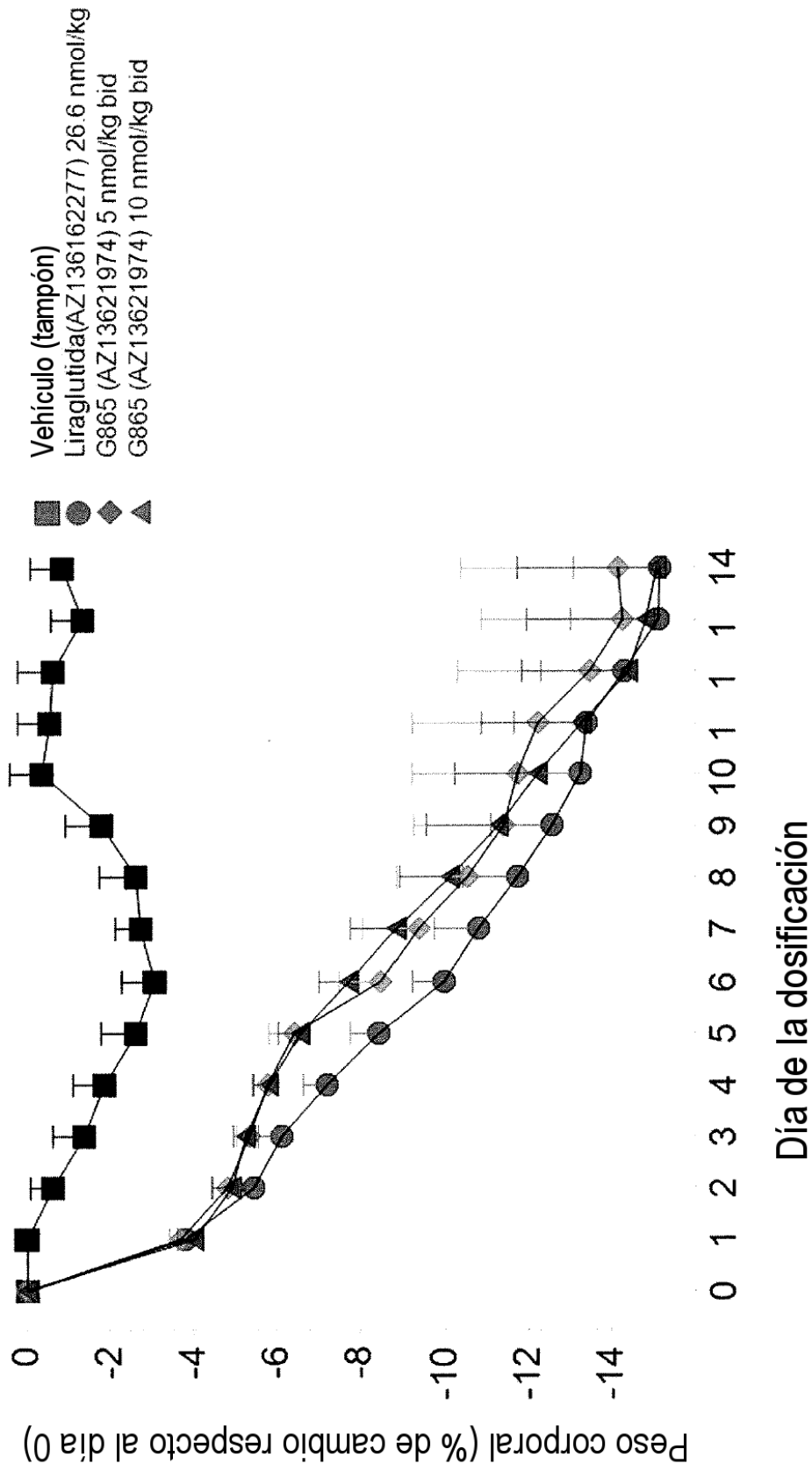


FIG. 6

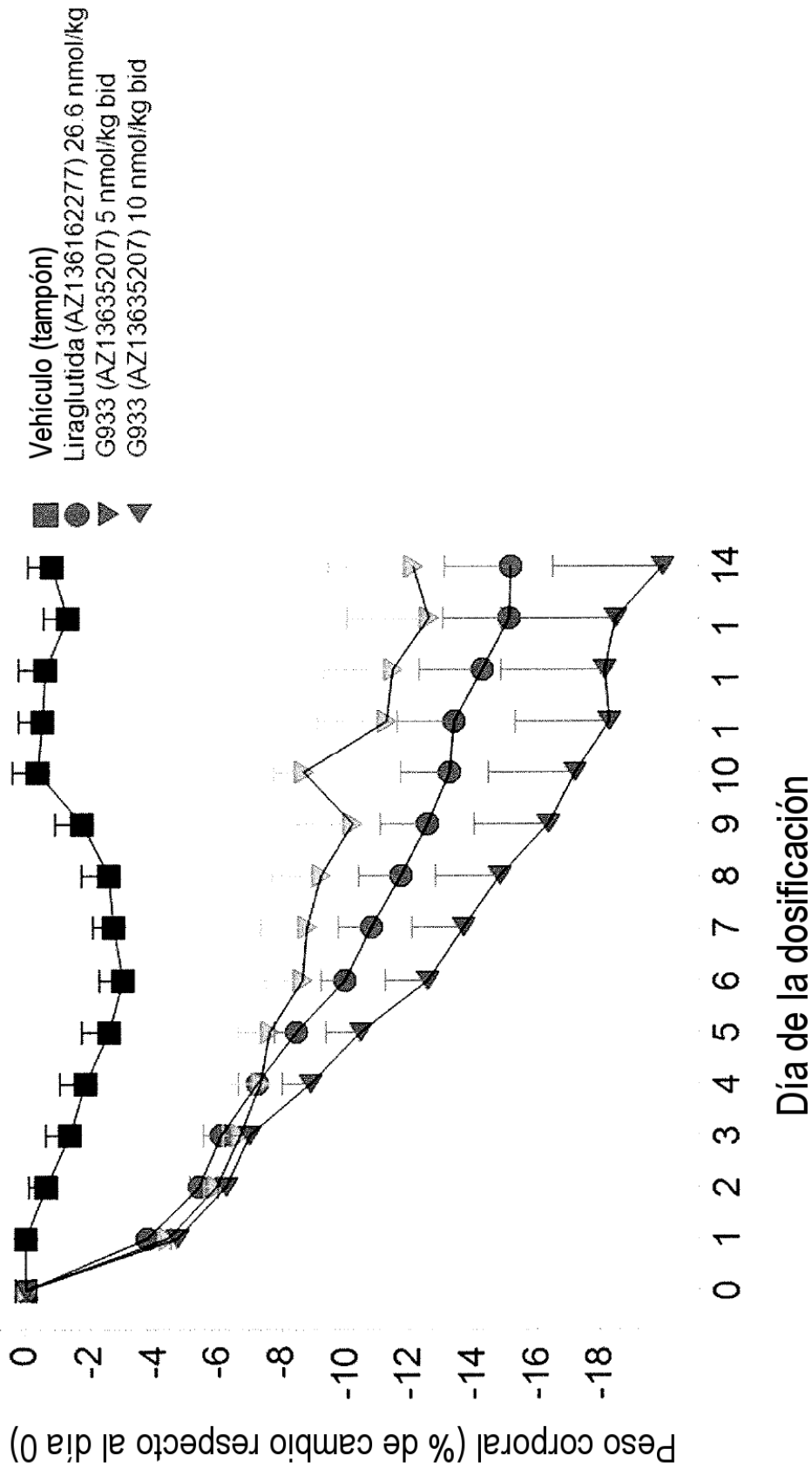


FIG. 7

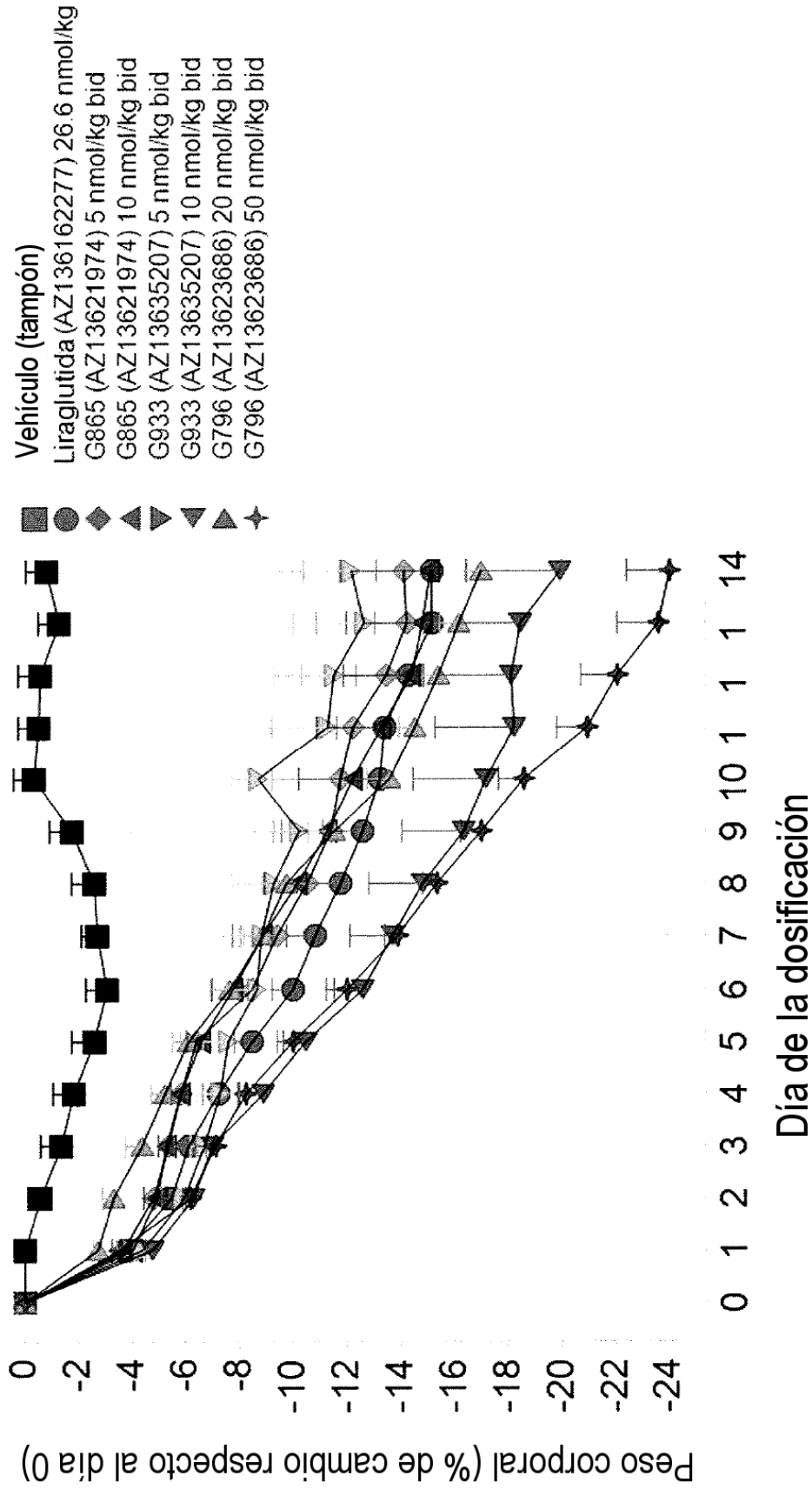


FIG. 8