

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 768 375**

51 Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.10.2014 PCT/EP2014/072294**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.04.2015 WO15055802**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.10.2014 E 14793463 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3057983**

54 Título: **Análogos de glucagón**

30 Prioridad:

17.10.2013 US 201361892250 P

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

22.06.2020

73 Titular/es:

**ZEALAND PHARMA A/S (50.0%)
Sydmarken 11
2860 Søborg, DK y
BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL
GMBH (50.0%)**

72 Inventor/es:

**RIBER, DITTE;
TOLBORG, JAKOB LIND y
HAMPRECHT, DIETER WOLFGANG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 768 375 T3

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

DESCRIPCIÓN

Análogos de glucagón

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a análogos de glucagón y a su uso médico, por ejemplo, en el tratamiento de la obesidad y el exceso de peso, la diabetes y otros trastornos metabólicos.

10 **Antecedentes de la invención**

El proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa de forma diferencial en los tejidos para formar una serie de péptidos derivados del proglucagón relacionados estructuralmente, incluyendo glucagón (Glu), péptido 1 similar al glucagón (GLP-1), péptido 2 similar al glucagón (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). Estas moléculas están implicadas en una amplia diversidad de funciones fisiológicas, incluyendo la homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos.

El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del proglucagón. La oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia completa de 29 aminoácidos del glucagón con una extensión carboxiterminal octapeptídica (aminoácidos 82 a 89 del proglucagón y denominado "péptido interviniente 1" o IP-1. El fragmento biológicamente activo principal de GLP-1 se produce como un péptido amidado C-terminalmente de 30 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 del proglucagón.

El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucosa en la sangre uniéndose a receptores de glucagón en los hepatocitos, provocando que el hígado libere glucosa almacenada en forma de glucógeno a través de la glucogenólisis. A medida que estos almacenes se agotan, el glucagón estimula el hígado para sintetizar glucosa adicional mediante la gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en el torrente sanguíneo, evitando el desarrollo de hipoglucemia.

El GLP 1 disminuye los niveles elevados de glucosa en sangre mediante la mejora de la secreción de insulina estimulada por glucosa y promueve la pérdida de peso principalmente a través de la disminución de la ingesta de alimentos.

La OXM se libera en la sangre en respuesta a la ingestión de alimentos y proporcionalmente al contenido calórico de la comida. Se ha demostrado que la OXM suprime el apetito e inhibe la ingesta de alimentos en seres humanos (Cohen et al., *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 88, 4696-4701, 2003, documento WO 2003/022304). Además de los efectos anorexígenos, que son similares a los del GLP-1, la OXM también debe afectar al peso corporal mediante otro mecanismo, puesto que las ratas tratadas con oxintomodulina muestran menos ganancia de peso corporal que las ratas alimentadas por parejas (Bloom, *Endocrinology* 2004, 145, 2687). El tratamiento de roedores obesos con OXM también mejora su tolerancia a la glucosa (Parlevliet et al., *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294, E142-7, 2008) y suprime la ganancia de peso corporal (documento WO 2003/022304). La OXM activa los receptores tanto del glucagón como del GLP-1 con una potencia dos veces mayor para el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1, pero es menos potente que el glucagón nativo y el GLP-1 sobre sus respectivos receptores. El glucagón humano también es capaz de activar ambos receptores, aunque con una fuerte preferencia por el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1. El GLP-1, por otro lado, no es capaz de activar los receptores de glucagón. El mecanismo de acción de la oxintomodulina no se comprende bien. En particular, no se sabe si algunos de los efectos extrahepáticos de la hormona están mediados a través de los receptores de GLP-1 y glucagón o a través de uno o más receptores no identificados.

Se ha demostrado que otros péptidos se unen y activan el receptor tanto del glucagón como del GLP-1 (Hjort et al., *Journal of Biological Chemistry*, 269, 30121-30124, 1994) y suprimen el aumento de peso corporal y reducen la ingesta de alimentos (véanse, por ejemplo, los documentos WO 2006/134340, WO 2007/100535, WO 2008/10101, WO 2008/152403, WO 2009/155257, WO 2009/155258, WO2010/070252, WO2010/070253, WO2010/070255, WO2010/070251, WO2011/006497, WO2011/160630, WO2011/160633, WO2013/092703, WO2014/041195. En el documento WO 2012/150503 se describen péptidos que tienen actividad agonista parcial en los receptores de glucagón y GLP-1.

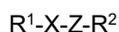
La obesidad es un problema de salud creciente globalmente asociado a diversas enfermedades, en particular a la enfermedad cardiovascular (ECV), la diabetes de tipo 2, la apnea obstructiva del sueño, ciertos tipos de cáncer y la osteoartritis. Como resultado, se ha descubierto que la obesidad reduce la esperanza de vida. De acuerdo con las proyecciones de 2005 de la Organización Mundial de la Salud, hay 400 millones de adultos (edad > 15) clasificados como obesos en todo el mundo. En los EE.UU., se cree que la obesidad es la segunda causa de muerte prevenible después del tabaquismo.

El aumento de la obesidad impulsa un aumento en la diabetes y aproximadamente el 90 % de las personas con

diabetes de tipo 2 pueden clasificarse como obesas. Hay 246 millones de personas en todo el mundo con diabetes y en 2025 se estima que 380 millones tendrán diabetes. Muchos tienen factores de riesgo cardiovascular adicionales, incluyendo LDL y triglicéridos altos/anormales y HDL bajo.

5 **Sumario de la invención**

La invención proporciona un compuesto que tiene la fórmula:



10 en donde

R¹ es H (es decir, hidrógeno), alquilo C₁₋₄, acetilo, formilo, benzoílo o trifluoroacetilo;
R² es OH o NH₂;

15 X es un péptido que tiene la secuencia:

H-X2-X3-GTFTSDYSKYL-X15-X16-X17-X18-A-X20-DFI-X24-WLE-X28-A

en donde:

20 X2 se selecciona entre Ac3c, Ac4c y Ac5c;

X3 se selecciona entre Gln e His;

X15 se selecciona entre Asp y Glu;

X16 se selecciona entre Glu, Lis y Ψ;

X17 se selecciona entre Lys, Arg y Ψ;

25 X18 se selecciona entre Ala y Arg;

X20 se selecciona entre Lys y Ψ;

X24 se selecciona entre Glu, Lys y Ψ;

X28 se selecciona entre Ser, Lys y Ψ;

30 en donde cada Ψ es un resto seleccionado independiente entre Lys, Arg, Orn y Cys y en donde la cadena lateral de cada resto Ψ está conjugada con un sustituyente lipófilo;

y en donde Z está ausente o es una secuencia de 1-20 unidades de aminoácidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn; o una sal o solvato de los mismos farmacéuticamente aceptables.

35 En algunas realizaciones, Ψ está presente en uno de X16, X17, X20, X24 y X28. Opcionalmente, Ψ está presente en no más de uno de X16, X17, X20, X24 y X28. Puede ser deseable que este sea el único resto Ψ presente en la molécula.

El péptido X puede tener una secuencia seleccionada entre:

40

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDKRAAKDFIEWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIKWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIKWLESA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEKA
H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEKA
H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA y

H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA

45 o

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEΨA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA y
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA

El compuesto de la invención puede seleccionarse entre:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDKRAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIKWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIKWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEKA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEKA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA-NH₂ y
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA-NH₂

5 o

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIΨWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERAAKDFIEWLEΨA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH₂ y
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂

10 Para evitar dudas, aquellas posiciones que no se indican expresamente para permitir la variabilidad son fijas y, por tanto, solo pueden incluir el resto indicado.

15 En todos los aspectos, el compuesto de la invención puede comprender uno o más restos resto Ψ. Cada resto Ψ se selecciona independientemente entre Lys, Arg, Orn y Cys y la cadena lateral de cada resto Ψ está conjugada con un sustituyente lipófilo como se describe en más detalle a continuación.

Puede ser deseable que el compuesto de la invención comprenda no más de tres restos Ψ, o no más de dos restos Ψ. En particular, puede ser deseable que el compuesto comprenda no más de un resto Ψ, es decir, ningún resto Ψ o exactamente un resto Ψ.

20 El sustituyente está normalmente conjugado con el grupo funcional en el extremo distal de la cadena lateral del carbono alfa. La capacidad de la cadena lateral para participar en interacciones mediadas por ese grupo funcional (por ejemplo, interacciones intra e intermoleculares) puede, por tanto, reducirse o eliminarse completamente por la presencia del sustituyente lipófilo. Por tanto, las propiedades globales del compuesto pueden ser relativamente insensibles a los cambios en el aminoácido real presente como resto Ψ. En consecuencia, se cree que cualquiera de los restos Lys, Arg, Orn y Cys puede estar presente en cualquier posición donde Ψ esté permitido. Sin embargo, en
 25 ciertas realizaciones, puede ser ventajoso que Ψ sea Lys.

30 Cuando está presente un resto Ψ, la cadena lateral de los restos Lys, Arg, Orn o Cys se conjuga con un sustituyente lipófilo.

Un sustituyente lipófilo puede tener la fórmula Z¹, donde Z¹ es un residuo lipófilo conjugado (unido covalentemente) directamente con la cadena lateral de los restos Lys, Arg, Orn o Cys relevantes, o Z¹Z², donde Z¹ es un residuo lipófilo, Z₂ es un espaciador y Z¹ se conjuga con la cadena lateral de los restos relevantes a través de Z².

R¹ puede seleccionarse entre H y alquilo C₁₋₄ (por ejemplo, metilo).

Los compuestos de la invención son péptidos análogos de glucagón. Las referencias en el presente documento a un péptido análogo de glucagón deben interpretarse como referencias a un compuesto de la invención o a un péptido P¹ o P¹-P² según lo requiera el contexto. La referencia a un compuesto de la invención debe tomarse como que incluye cualquier sal farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, una sal de acetato o cloruro) o un solvato del mismo, a menos que se indique lo contrario o se excluya por el contexto.

La invención proporciona una composición que comprende un compuesto de la invención como se define en el presente documento (incluyendo sales o solvatos farmacéuticamente aceptables del mismo, como ya se ha descrito) en mezcla con un vehículo. En realizaciones preferidas, la composición es una composición farmacéutica y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable. El péptido análogo de glucagón puede estar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable del análogo de glucagón.

Los compuestos que se describen en el presente documento encuentran un uso, entre otras cosas, para prevenir la ganancia de peso o para promover la pérdida de peso. "Prevenir" significa inhibir o reducir cuando se compara con la ausencia de tratamiento y no tiene por objeto necesariamente implicar el cese completo de la ganancia de peso. Los péptidos pueden provocar una disminución en la ingesta de alimentos y/o un mayor gasto de energía, dando como resultado el efecto observado sobre el peso corporal. Independientemente de su efecto sobre el peso corporal, los compuestos de la invención pueden tener un efecto beneficioso sobre el control de la glucosa y/o sobre los niveles de colesterol circulantes, siendo capaces de reducir los niveles circulantes de LDL y aumentar la relación HDL/LDL. Por tanto, los compuestos de la invención pueden usarse para la terapia directa o indirecta de cualquier afección provocada o caracterizada por un exceso de peso corporal, tal como el tratamiento y/o la prevención de obesidad, obesidad mórbida, inflamación vinculada a obesidad, colecistopatía vinculada a obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad. También pueden usarse para la prevención de afecciones provocadas o caracterizadas por un control inadecuado de la glucosa o dislipidemia (por ejemplo, niveles elevados de LDL o disminución de la relación HDL/LDL), diabetes (especialmente diabetes de tipo 2), síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular. Sus efectos en estas afecciones pueden ser resultado o asociarse a su efecto sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

La invención también proporciona un compuesto de la invención para su uso en terapia, en particular para su uso en un método de tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

El compuesto de la invención puede administrarse como parte de una terapia de combinación con un agente para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la dislipidemia o la hipertensión.

En dichos casos, los dos agentes activos pueden proporcionarse juntos o por separado y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones separadas.

Por tanto, el compuesto de la invención puede usarse en combinación con un agente antidiabético que incluye, pero no se limita a, una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o glinida (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, una gliptazona, un inhibidor de SGLT2, una insulina o un análogo de insulina. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a Lantus™, Novorapid™, Humalog™, Novomix™, Actraphane HM™, Levemir™ y Apidra™.

El compuesto puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad que incluye, pero no se limita a, un agonista del receptor 1 del péptido similar al glucagón, péptido YY o análogo del mismo, antagonista del receptor cannabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina, antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación de inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y antagonista del receptor opioide (por ejemplo, una combinación de bupropión y naltrexona) o un agente serotoninérgico (por ejemplo, lorcaserina).

El compuesto puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antihipertensivo que incluye, pero no se limita a, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueante del receptor de angiotensina II, diurético, betabloqueante o bloqueante de canales de calcio.

El compuesto puede usarse en combinación con un agente antidislipidemia que incluye, pero no se limita a, una estatina, un fibrato, una niacina o un inhibidor de la absorción de colesterol.

Por tanto, la invención proporciona adicionalmente una composición o kit terapéutico que comprende un compuesto de la invención y, por ejemplo, un agente antidiabético, agente antiobesidad, agente antihipertensivo o agente antidislipidemia como se ha descrito anteriormente. También se proporciona una composición o kit terapéutico de este tipo para su uso en un método de tratamiento médico, especialmente para el tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

El compuesto de la invención puede fabricarse mediante química de síntesis. En consecuencia, la invención proporciona un método de síntesis de un compuesto de la invención.

Descripción detallada de la invención

5 En toda la presente memoria descriptiva, se usan los códigos convencionales de una letra y tres letras para los aminoácidos naturales, así como abreviaturas generalmente aceptadas para otros aminoácidos, tales como D-Ala o DAla (D-alanina), Aib (ácido α -aminoisobutírico), Orn (ornitina), NMeSer o N-Me-Ser (N-metil serina), Ac3c (ácido 1-amino-ciclopropanocarboxílico), Ac4c (ácido 1-amino-ciclobutanocarboxílico), Ac5c (ácido 1-amino-ciclopentanocarboxílico), Abu (ácido (S)-2-aminobutírico).

Ac3c, Ac4c y Ac5c tienen estructuras similares y, en cierta medida, son intercambiables, aunque puede preferirse Ac4c.

15 El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 53 a 81 del preproglucagón y tiene la secuencia His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr. La oxintomodulina (OXM) es un péptido de 37 aminoácidos que incluye la secuencia de 29 aminoácidos completa de glucagón con una extensión carboxiterminal octapeptídica (aminoácidos 82 a 89 de preproglucagón, que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala y denominado "péptido interviniente 1" o IP-1; la secuencia completa de oxintomodulina humana es, por tanto, His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala). El fragmento biológicamente activo principal de GLP-1 se produce como un péptido amidado C-terminalmente de 30 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 98 a 127 del preproglucagón.

25 La expresión "glucagón nativo" se refiere, por tanto, al glucagón humano nativo que tiene la secuencia H-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-OH.

30 Los aminoácidos dentro de la secuencia X de los compuestos de la invención pueden considerarse numerados correlativamente de 1 a 29 en la dirección convencional N-terminal a C-terminal. La referencia a una "posición" dentro de X ha de interpretarse en consecuencia, como ha de hacerse con la referencia a posiciones dentro del glucagón humano nativo y otras moléculas.

35 Un compuesto de la invención puede comprender una secuencia peptídica C-terminal Z de 1-20 aminoácidos, por ejemplo, para estabilizar la conformación y/o estructura secundaria del péptido análogo de glucagón, y/o para hacer que el péptido análogo de glucagón sea más resistente a la hidrólisis enzimática, por ejemplo, como se describe en el documento WO99/46283.

40 Cuando está presente, Z representa una secuencia peptídica de 1-20 restos aminoacídicos, por ejemplo, en el intervalo de 1-15, más preferentemente en el intervalo de 1-10, en particular en el intervalo de 1-7 restos aminoacídicos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 restos aminoacídicos, tales como 6 restos aminoacídicos. Cada uno de los restos aminoacídicos en la secuencia peptídica Z puede seleccionarse independientemente entre Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu (ácido 2,4-diaminobutírico), Dpr (ácido 2,3-diaminopropanoico) y Orn (ornitina). Preferentemente, los restos aminoacídicos se seleccionan entre Ser, Thr, Tyr, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn, más preferentemente se seleccionan exclusivamente entre Glu, Lys y Cys. Los aminoácidos mencionados anteriormente pueden tener cualquiera de las configuraciones de D o L, que, en ciertas realizaciones, tienen una configuración L. Son secuencias Z particularmente preferidas, secuencias de cuatro, cinco, seis o siete restos de lisina consecutivos (es decir, Lys₃, Lys₄, Lys₅, Lys₆ o Lys₇) y en particular cinco o seis restos de lisina consecutivos. En el documento WO 01/04156, se muestran otros ejemplos de secuencias Z. Como alternativa, el resto C-terminal de la secuencia Z puede ser un resto Cys. Esto puede ayudar a la modificación (por ejemplo, PEGilación o conjugación a albúmina) del compuesto. En dichas realizaciones, la secuencia Z puede tener una longitud, por ejemplo, de un solo aminoácido (es decir, Z = Cys) o puede tener una longitud de dos, tres, cuatro, cinco, seis o incluso más aminoácidos. Por tanto, los otros aminoácidos sirven como un espaciador entre el péptido X y el resto Cys terminal.

55 La secuencia peptídica Z tiene una identidad de secuencia de no más del 25 % con la secuencia correspondiente de la porción IP-1 de la OXM humana (que tiene la secuencia Lys-Arg-Asn-Arg-Asn-Asn-Ile-Ala).

60 La "identidad de secuencia de aminoácidos en porcentaje (%)" de una secuencia peptídica o polipeptídica dada con respecto a otra secuencia polipeptídica (por ejemplo, IP-1) se calcula como el porcentaje de restos aminoacídicos en la secuencia peptídica dada que son idénticos a restos aminoacídicos posicionados correspondientemente en la secuencia correspondiente de ese otro polipéptido cuando los dos se alinean entre sí, introduciendo huecos para una alineación óptima si fuera necesario. Los valores de % de identidad puede determinarse usando WU-BLAST-2 (Altschul et al., *Methods in Enzymology*, 266: 460-480 (1996)). WU-BLAST-2 usa varios parámetros de búsqueda, la mayoría de los cuales se establecen en los valores predeterminados. Los parámetros ajustables se establecen con los siguientes valores: extensión de superposición = 1, fracción de superposición = 0,125, umbral de palabra (T) = 11. Un valor de identidad de secuencia de aminoácidos en % se determina por el número de restos idénticos

coincidentes según se determina por WU-BLAST-2, dividido por el número total de restos de la secuencia de referencia (ignorándose los huecos introducidos por WU-BLAST-2 en la secuencia de referencia para maximizar la puntuación de alineación), multiplicado por 100.

- 5 Por tanto, cuando Z se alinea óptimamente con los 8 aminoácidos ácidos de IP-1, tiene no más de dos aminoácidos que son idénticos a los aminoácidos correspondientes de IP-1.

En ciertas realizaciones, Z está ausente.

- 10 Si el compuesto de la invención contiene un resto Ψ , entonces Ψ comprende un resto Lys, Arg, Orn o Cys cuya cadena lateral está conjugada con un sustituyente lipófilo. Puede preferirse Lys. El sustituyente lipófilo puede estar unido covalentemente a un átomo en la cadena lateral de aminoácidos, o alternativamente, puede estar conjugado a la cadena lateral de aminoácidos mediante un espaciador.

- 15 Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, se cree que el sustituyente lipófilo se une a proteínas plasmáticas (por ejemplo, albúmina) en el torrente sanguíneo, protegiendo de este modo los compuestos de la invención de la degradación enzimática y potenciando de este modo la semivida de los compuestos. También puede modular la potencia del compuesto, por ejemplo, con respecto al receptor de glucagón y/o al receptor de GLP-1.

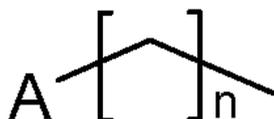
- 20 En ciertas realizaciones, solo una cadena lateral de aminoácidos se conjuga con un sustituyente lipófilo. En otras realizaciones, cada una de dos cadenas laterales de aminoácidos se conjugan con un sustituyente lipófilo. En otras realizaciones adicionales, cada una de tres o incluso más cadenas laterales de aminoácidos se conjugan con un sustituyente lipófilo. Cuando un compuesto contiene dos o más sustituyentes lipófilos, estos pueden ser iguales o diferentes.

- 25 El sustituyente lipófilo puede comprender o consistir en un residuo lipófilo Z^1 que puede estar unido covalentemente directamente a un átomo en la cadena lateral de aminoácidos, o alternativamente puede conjugarse con la cadena lateral de aminoácidos a través de un espaciador Z^2 .

- 30 El término "conjugado" se usa en el presente documento para describir la unión física de un residuo químico identificable con otro, y la relación estructural entre dichos residuos. No debe tomarse como que implica ningún método de síntesis particular.

- 35 El residuo lipófilo puede estar unido a la cadena lateral de aminoácidos o al espaciador a través de un éster, un éster sulfonílico, un tioéster, una amida, un carbamato, una urea o una sulfonamida. Por consiguiente, se entenderá que preferentemente el sustituyente lipófilo incluye un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S que forma parte del éster, éster sulfonílico, tioéster, amida o sulfonamida. Preferentemente, un grupo acilo en el sustituyente lipófilo forma parte de una amida o éster con la cadena lateral de aminoácidos o el espaciador. El resto lipófilo puede incluir una cadena de hidrocarburo que tiene de 4 a 30 átomos de carbono. 40 Preferentemente tiene al menos 8 o 12 átomos de C, y preferentemente tiene 24 átomos de C o menos, o 20 átomos de C o menos. La cadena de hidrocarburo puede ser lineal o ramificada y puede estar saturada o insaturada. Se entenderá que la cadena de hidrocarburo está preferentemente sustituida por un residuo que forma parte de la unión a la cadena lateral de aminoácidos o al espaciador, por ejemplo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un S átomo. Lo más preferentemente, la cadena de hidrocarburo está sustituida por acilo y, por 45 consiguiente, la cadena de hidrocarburo puede ser parte de un grupo alcanilo, por ejemplo palmitoilo, caproilo, lauroilo, miristoilo o estearoilo.

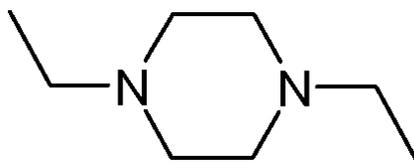
En consecuencia, el residuo lipófilo puede tener la fórmula que se muestra a continuación:



- 50 A puede ser, por ejemplo, un grupo acilo, un grupo sulfonilo, NH, N-alquilo, un átomo de O o un átomo de S, preferentemente acilo, n es un número entero de 3 a 29, preferentemente de 7 a 25, más preferido de 11 a 21, aún más preferido de 15 a 19.

- 55 La cadena de hidrocarburo puede estar adicionalmente sustituida. Por ejemplo, puede estar adicionalmente sustituida por hasta tres sustituyentes seleccionados entre NH₂, OH y COOH, especialmente en el extremo libre de la molécula distal del espaciador o péptido. Por ejemplo, puede comprender un grupo de ácido carboxílico libre.

- 60 Si la cadena de hidrocarburo está adicionalmente sustituida, preferentemente está adicionalmente sustituida solo por un sustituyente. Alternativa o adicionalmente, la cadena de hidrocarburo puede incluir un cicloalcano o heterocicloalcano, por ejemplo, como se muestra a continuación:



5 Preferentemente, el cicloalcano o heterocicloalcano es un anillo de seis miembros. Lo más preferentemente, es piperidina.

10 Como alternativa, el resto lipófilo puede estar basado en un esqueleto de ciclopentanofenantreno, que puede estar parcial o totalmente insaturado o saturado. Cada uno de los átomos de carbono en el esqueleto puede estar sustituido por Me u OH. Por ejemplo, el sustituyente lipófilo puede ser colilo, desoxicolilo o litocolilo.

15 Como se mencionó anteriormente, el residuo lipófilo puede conjugarse con la cadena lateral de aminoácidos mediante un espaciador. Cuando está presente, el espaciador se une al residuo lipófilo y a la cadena lateral de aminoácidos. El espaciador puede estar unido al residuo lipófilo y a la cadena lateral de aminoácidos de forma independiente por un éster, un éster sulfonílico, un tioéster, una amida, un carbamato, una urea o una sulfonamida. En consecuencia, puede incluir dos residuos seleccionados independientemente de acilo, sulfonilo, un átomo de N, un átomo de O o un átomo de S. El espaciador puede tener la fórmula:



20 en donde cada uno de B y D se seleccionan independientemente entre acilo, sulfonilo, NH, N-alquilo, un átomo de O y un átomo de S, preferentemente de acilo y NH. Preferentemente, n es un número entero de 1 a 10, preferentemente de 1 a 5. El espaciador puede estar sustituido adicionalmente por uno o más sustituyentes seleccionados entre alquilo C₀₋₆, alquilamina C₀₋₆, hidroxialquilo C₀₋₆ y carboxialquilo C₀₋₆.

25 Como alternativa, el espaciador puede tener dos o más unidades de repetición de la fórmula anterior. Cada uno de B, D y n se seleccionan independientemente para cada unidad de repetición. Las unidades de repetición adyacentes pueden unirse covalentemente entre sí a través de sus respectivos residuos B y D. Por ejemplo, los residuos B y D de las unidades de repetición adyacentes pueden formar juntos un éster, un éster sulfonílico, un tioéster, una amida o una sulfonamida. Las unidades B y D libres en cada extremo del espaciador están unidas a la cadena lateral de aminoácidos y al residuo lipófilo como se describe anteriormente.

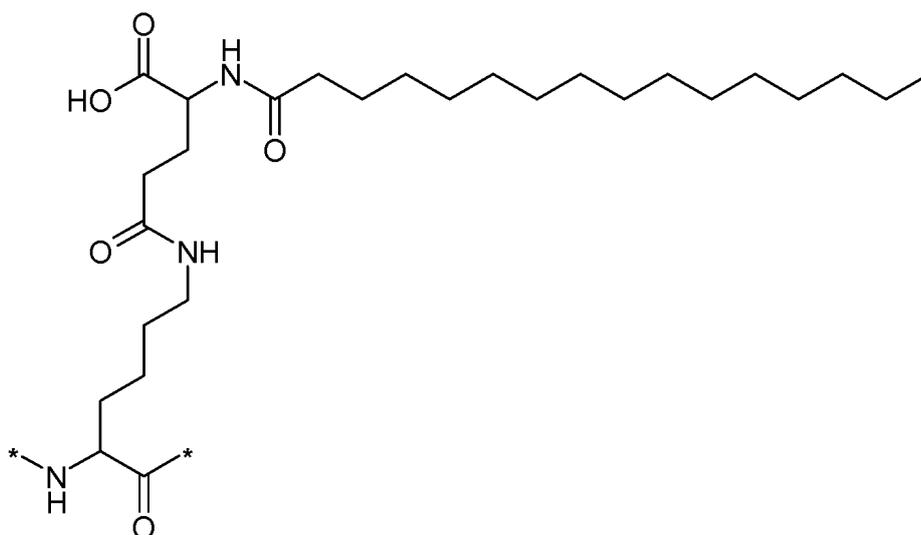
30 Preferentemente, el espaciador tiene cinco o menos, cuatro o menos o tres o menos unidades de repetición. Más preferentemente el espaciador tiene dos unidades de repetición, o es una sola unidad.

35 El espaciador (o una o más de las unidades de repetición del espaciador, si tiene unidades de repetición) puede ser, por ejemplo, un aminoácido natural o no natural. Se entenderá que para los aminoácidos que tienen cadenas laterales funcionalizadas, B y/o D pueden ser un residuo dentro de la cadena lateral del aminoácido. El espaciador puede ser cualquier aminoácido natural o no natural. Por ejemplo, el espaciador (o una o más de las unidades de repetición del espaciador, si tiene unidades de repetición) puede ser Gly, Pro, Ala, Val, Leu, Ile, Met, Cys, Phe, Tyr, 40 Trp, His, Lys, Arg, Gin, Asn, α-Glu, γ-Glu, Asp, Ser Thr, Gaba, Aib, β-Ala, 5-aminopentanoilo, 6-aminohexanoilo, 7-aminohexanoilo, 8-aminooctanoilo, 9-aminononanoilo o 10-aminodecanoilo.

Por ejemplo, el espaciador puede ser un solo aminoácido seleccionado entre γ-Glu, Gaba, β-Ala y α-Glu.

45 Los aminoácidos dentro del espaciador que tienen centros estereogénicos pueden ser racémicos, enantioenriquecidos o enantiopuros. En algunas realizaciones, el o cada aminoácido dentro del espaciador es independientemente un L-aminoácido. En algunas realizaciones, el o cada aminoácido es independientemente un D-aminoácido.

50 En la siguiente fórmula se muestra un ejemplo de un sustituyente lipófilo que comprende un residuo lipófilo y un espaciador:



5 Aquí, un resto Lys en el compuesto de la presente invención se une covalentemente a γ -Glu (el espaciador) a través de un residuo amida. El palmitoilo (es decir, hexadecanoilo) se une covalentemente al espaciador γ -Glu a través de un residuo amida, creando así un grupo hexadecanoil-isoGlu.

Este grupo puede estar presente como Ψ en cualquier compuesto de la invención.

10 Como alternativa o adicionalmente, una o más cadenas laterales de aminoácidos en el compuesto de la invención pueden conjugarse con un residuo polimérico, por ejemplo, para aumentar la solubilidad y/o la semivida *in vivo* (por ejemplo, en plasma) y/o la biodisponibilidad. También se sabe que dicha modificación reduce la eliminación (por ejemplo, eliminación renal) de proteínas y péptidos terapéuticos.

15 El lector experto estará al tanto de técnicas adecuadas que pueden usarse para realizar las reacciones de acoplamiento con espaciador y residuo lipófilo usando metodología de síntesis general indicada, por ejemplo, en "*Comprehensive Organic Transformations, A Guide to Functional Group Preparations*", 2ª edición, Larock, R. C.; Wiley-VCH: Nueva York, 1999. Dichas transformaciones pueden tener lugar en cualquier etapa adecuada durante el proceso de síntesis.

20 El residuo polimérico es preferentemente soluble en agua (anfílico o hidrófilo), no tóxico y farmacéuticamente inerte. Los residuos poliméricos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), homopolímeros o copolímeros de PEG, un polímero de PEG sustituido con monometilo (mPEG) y polioxietilenglicerol (POG). Véase, por ejemplo, *Int. J. Hematology* 68: 1 (1998); *Bioconjugate Chem.* 6: 150 (1995); y *Crit. Rev. Therap. Drug Carrier Sys.* 9:249 (1992). Otros residuos poliméricos adecuados incluyen poliaminoácidos tales como polilisina, ácido poliaspártico y ácido poliglutámico (véase, por ejemplo, Gombotz, et al. (1995), *Bioconjugate Chem.* vol. 6: 332-351; Hudecz et al. (1992), *Bioconjugate Chem.* vol. 3, 49-57; Tsukada et al. (1984), *J. Natl. Cáncer Inst.*, vol 73,: 721-729; y Pratesi, et al. (1985), *Br. J. Cancer*, vol. 52: 841-848).

30 El residuo polimérico puede ser de cadena lineal o ramificada. Puede tener un peso molecular de 500-40 000 Da, por ejemplo, de 500-10 000 Da, 1 000-5 000 Da, 10 000-20 000 Da o de 20 000-40 000 Da.

Un compuesto de la invención puede comprender dos o más de dichos residuos, en cuyo caso el peso molecular total de todos estos residuos estará generalmente dentro de los intervalos proporcionados anteriormente.

35 El residuo polimérico se puede acoplar (por enlace covalente) con un grupo amino, carboxilo o tiol de una cadena lateral de aminoácidos. Son ejemplos preferidos, el grupo tiol de restos de Cys y el grupo amino épsilon de restos de Lys. También se pueden usar los grupos carboxilo de los restos de Asp y Glu.

40 El lector experto estará al tanto de pueden usarse técnicas adecuadas para realizar la reacción de acoplamiento. Por ejemplo, un residuo de PEG que lleva un grupo metoxi se puede acoplar a un grupo tiol de Cys mediante un enlace de maleimida usando reactivos disponibles en el comercio de Nektar Therapeutics. Véase también el documento WO 2008/101017, y las referencias citadas anteriormente, para detalles de química adecuada.

45 Síntesis peptídica

Los compuestos de la presente invención pueden fabricarse mediante métodos de síntesis convencionales, o mediante cualquier otro método del estado de la técnica. Por tanto, los análogos de glucagón pueden sintetizarse de

varias maneras, incluyendo, por ejemplo, un método que comprende sintetizar el péptido por medio de una metodología en fase sólida o en fase líquida, ya sea por etapas o por ensamblaje de fragmentos, y aislar y purificar el producto peptídico final.

- 5 Se prefiere sintetizar los análogos de la invención por medio de síntesis de péptidos en fase sólida o en fase líquida. En este contexto, se hace referencia al documento WO 98/11125 y, entre muchos otros, a Fields, GB et al., 2002, "*Principles and practice of solid-phase peptide synthesis*". En: *Synthetic Peptides* (2ª edición) y los Ejemplos en el presente documento.

10 Eficacia

La unión de los compuestos pertinentes a receptores de GLP-1 o glucagón (Glu) puede usarse como una indicación de la actividad agonista, pero, en general se prefiere usar un ensayo biológico que mida la señalización intracelular provocada por la unión del compuesto al receptor pertinente. Por ejemplo, la activación del receptor de glucagón por un agonista de glucagón estimulará la formación de AMP cíclico celular (AMPC). De forma similar, la activación del receptor de GLP-1 por un agonista de GLP-1 estimulará la formación de AMPC celular. Por tanto, la producción de AMPC en células adecuadas que expresan uno de estos dos receptores puede usarse para controlar la actividad del receptor pertinente. El uso de un par adecuado de tipos celulares, expresando cada uno un receptor, pero no el otro, puede usarse, por tanto, para determinar la actividad agonista hacia ambos tipos de receptor.

20 El experto estará al tanto de formatos de ensayo adecuados y se proporcionan ejemplos a continuación. El receptor de GLP-1 y/o el receptor de glucagón pueden tener la secuencia de los receptores como se describe en los ejemplos. Por ejemplo, los ensayos pueden emplear el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) que tiene el número de acceso principal GI: 4503947 y/o el receptor de péptido 1 similar a glucagón humano (GLP-1R) que tiene el número de acceso principal GI: 166795283. (en aquellos donde se hace referencia a las secuencias de las proteínas precursoras, debe entenderse, por supuesto, que los ensayos pueden hacer uso de la proteína madura, que carece de la secuencia señal).

30 Los valores de CE_{50} pueden usarse como una medida numérica de la potencia agonista en un receptor dado. Un valor de CE_{50} es una medida de la concentración de un compuesto necesaria para conseguir la mitad de la actividad máxima de ese compuesto en un ensayo particular. De este modo, por ejemplo, puede considerarse que un compuesto que tiene una CE_{50} [GLP-1] más baja que la CE_{50} [GLP-1] de glucagón en un ensayo particular tiene una potencia agonista del receptor de GLP-1 mayor que el glucagón.

35 Los compuestos que se describen en la presente memoria descriptiva son normalmente agonistas duales de GluGLP-1, según se determina mediante la observación de que son capaces de estimular la formación de AMPC tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GLP-1. La estimulación de cada receptor puede medirse en ensayos independientes y después compararse entre sí.

40 Al comparar el valor de CE_{50} para el receptor de GLP-1 (CE_{50} [GLP-1-R]) con el valor de CE_{50} para el receptor de glucagón, (CE_{50} [GlucagónR]) para un compuesto dado, la selectividad para GLP-1R relativa puede calcularse de la siguiente manera:

$$\text{Selectividad de CLP-1R relativa [compuesto]} = (CE_{50} \text{ [GLP-1R]}) / (CE_{50} \text{ [Glucagón-R]})$$

45 El término " CE_{50} " significa la mitad de la Concentración Eficaz, normalmente en un receptor particular, o en el nivel de un marcador particular para la función del receptor, y puede referirse a una actividad inhibitoria o antagonista, dependiendo del contexto bioquímico específico.

50 Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, la selectividad relativa para un compuesto puede permitir que su efecto sobre el GLP-1 o el receptor de glucagón se compare directamente con su efecto sobre el otro receptor. Por ejemplo, cuanto mayor es la selectividad relativa para GLP-1 de un compuesto, más eficaz puede ser ese compuesto sobre el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón. Normalmente, los resultados se comparan para los receptores de glucagón y GLP-1 de la misma especie, por ejemplo, glucagón humano y receptores de GLP-1, o glucagón murino y receptores de GLP-1.

60 Los compuestos de la invención pueden tener una selectividad para GLP-1R relativa más alta que el glucagón humano porque en un nivel particular de actividad agonista de glucagón-R, el compuesto puede mostrar un nivel más alto de actividad agonista de GLP-1R (es decir, mayor potencia en el receptor de GLP-1) que el glucagón. Se entenderá que la potencia absoluta de un compuesto particular en los receptores de glucagón y de GLP-1 puede ser más alta, más baja o aproximadamente igual a la del glucagón humano nativo, siempre que se consiga la selectividad para GLP-1R relativa adecuada.

65 Sin embargo, los compuestos de la presente invención pueden tener una CE_{50} [GLP-1 R] más baja que el glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE_{50} [GLP-1-R] más baja que el glucagón mientras mantienen una CE_{50} [Glucagón-R] que es menos de 10 veces más alta que la del glucagón humano, menos de 5 veces más alta que la

del glucagón humano o menos de 2 veces más alta que la del glucagón humano.

Los compuestos de la invención pueden tener una CE_{50} [Glucagón-R] que sea menos de dos veces la del glucagón humano. Los compuestos pueden tener una CE_{50} [Glucagón-R] que sea menos de dos veces la del glucagón humano y pueden tener una CE_{50} [GLP-1R] que sea menos de la mitad de la del glucagón humano, menos de una quinta parte de la del glucagón humano o menos de una décima parte de la del glucagón humano.

La selectividad relativa para GLP-1R de los compuestos puede estar entre 0,05 y 20. Por ejemplo, los compuestos pueden tener una selectividad relativa de 0,05-0,20, 0,1-0,30, 0,2-0,5, 0,3-0,7 o 0,5-1,0; 1,0-2,0, 1,5-3,0, 2,0-4,0 o 2,5-5,0; o 0,05-20, 0,075-15, 0,1-10, 0,15-5, 0,75-2,5 o 0,9-1,1.

En ciertas realizaciones, puede ser deseable que la CE_{50} de cualquier compuesto dado tanto para el Glucagón-R como para el GLP-1R, por ejemplo, para el glucagón humano y los receptores de GLP-1, sea inferior a 1 nM.

15 Usos terapéuticos

Los compuestos de la invención pueden proporcionar opciones atractivas de tratamiento y/o prevención para, entre otras cosas, la obesidad y enfermedades metabólicas incluyendo la diabetes, como se analiza a continuación.

La diabetes comprende un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia resultado de defectos en la secreción de insulina, la acción de la insulina o ambos. Los signos agudos de la diabetes incluyen una producción excesiva de orina, dando como resultado sed compensatoria y un aumento de la ingesta de líquidos, visión borrosa, pérdida de peso inexplicable, letargo y cambios en el metabolismo energético. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a daño a largo plazo, disfunción y fallo de diversos órganos, especialmente los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos. La diabetes se clasifica en diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 y diabetes gestacional sobre la base de las características patológicas.

La diabetes de tipo 1 representa el 5-10 % de todos los casos de diabetes y es provocada por la destrucción autoinmune de células pancreáticas secretoras de insulina.

La diabetes de tipo 2 representa el 90-95 % de los casos de diabetes y es el resultado de un conjunto complejo de trastornos metabólicos. La diabetes de tipo 2 es la consecuencia de que la producción endógena de insulina sea insuficiente para mantener los niveles de glucosa en plasma por debajo de los umbrales diagnósticos.

La diabetes gestacional se refiere a cualquier grado de intolerancia a la glucosa identificada durante el embarazo.

La prediabetes incluye la glucosa en ayunas alterada y la tolerancia a la glucosa alterada y se refiere a los estados que se producen cuando los niveles de glucosa en sangre están elevados, pero por debajo de los niveles establecidos para el diagnóstico clínico de la diabetes.

Una gran proporción de personas con diabetes de tipo 2 y prediabetes tienen un mayor riesgo de morbilidad y mortalidad debido a la alta prevalencia de factores de riesgo metabólicos adicionales, incluyendo obesidad abdominal (tejido adiposo excesivo alrededor de los órganos internos abdominales), dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa sanguínea incluyendo triglicéridos altos, colesterol HDL bajo y/o colesterol LDL alto, lo que fomenta la acumulación de placa en las paredes arteriales), presión arterial elevada (hipertensión) un estado protrombótico (por ejemplo, fibrinógeno o inhibidor 1 del activador del plasminógeno altos en sangre) y estado proinflamatorio (por ejemplo, proteína C reactiva elevada en sangre).

Por el contrario, la obesidad conlleva un mayor riesgo de desarrollar prediabetes, diabetes de tipo 2 y, por ejemplo, ciertos tipos de cáncer, apnea obstructiva del sueño y colecistopatía.

La dislipidemia se asocia a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular. La lipoproteína de alta densidad (HDL) es de importancia clínica puesto que existe una correlación inversa entre las concentraciones plasmáticas de HDL y el riesgo de enfermedad aterosclerótica. La mayor parte del colesterol almacenado en las placas ateroscleróticas se origina en las LDL y, por tanto, las concentraciones elevadas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se asocian estrechamente a la aterosclerosis. La relación HDL/LDL es un indicador de riesgo clínico para la aterosclerosis y la aterosclerosis coronaria en particular.

El síndrome metabólico se caracteriza por un grupo de factores de riesgo metabólico en una persona. Incluyen la obesidad abdominal (tejido adiposo excesivo alrededor de los órganos abdominales internos), dislipidemia aterogénica (trastornos de la grasa sanguínea incluyendo triglicéridos altos, colesterol HDL bajo y/o colesterol LDL alto, lo que fomenta la acumulación de placa en las paredes arteriales), presión arterial elevada (hipertensión), resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, estado protrombótico (por ejemplo, fibrinógeno o inhibidor 1 del activador del plasminógeno altos en la sangre) y estado proinflamatorio (por ejemplo, proteína C reactiva elevada en la sangre).

Las personas con el síndrome metabólico tienen un mayor riesgo de enfermedad coronaria y otras enfermedades relacionadas con otras manifestaciones de arterioesclerosis (por ejemplo, ictus y enfermedad vascular periférica). El factor de riesgo subyacente dominante para este síndrome parece ser la obesidad abdominal.

5 Sin desear quedar ligados a teoría particular alguna, se cree que los compuestos de la invención actúan como agonistas duales tanto sobre el receptor de glucagón humano como sobre el receptor de GLP1 humano, abreviado en el presente documento como agonistas de GluGLP-1 duales. El agonista dual puede combinar el efecto del glucagón, por ejemplo, sobre el metabolismo de las grasas, con el efecto del GLP-1, por ejemplo, sobre los niveles de glucosa en sangre y la ingesta de alimentos. Por tanto, pueden actuar para acelerar la eliminación del tejido
10 adiposo excesivo, inducir una pérdida de peso sostenible y mejorar el control glucémico. Los agonistas duales de GluGLP-1 también pueden actuar para reducir los factores de riesgo cardiovasculares, tales como el colesterol alto, el colesterol LDL alto o las relaciones bajas de colesterol HDL/LDL.

15 Por tanto, los compuestos de la presente invención pueden usarse en un sujeto que los necesite como agentes farmacéuticos para prevenir el aumento de peso, promover la pérdida de peso, reducir el exceso de peso corporal o tratar la obesidad (por ejemplo, mediante el control del apetito, la alimentación, la ingesta de alimentos, la ingesta de calorías y/o el gasto energético), incluyendo obesidad mórbida, así como las enfermedades y afecciones asociadas que incluyen, pero no se limitan a, inflamación vinculada a obesidad, colecistopatía vinculada a obesidad y apnea del sueño inducida por obesidad. Los compuestos de la invención también pueden usarse para el tratamiento de
20 afecciones provocadas por, o asociadas a, un control alterado de la glucosa, incluyendo el síndrome metabólico, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la prediabetes, la glucosa en ayunas elevada, la diabetes de tipo 2, la hipertensión, la aterosclerosis, la arterioesclerosis, la cardiopatía coronaria, la arteriopatía periférica y el ictus, en un sujeto que lo necesite. Algunas de estas afecciones pueden asociarse a la obesidad. Sin embargo, los efectos de los compuestos de la invención sobre estas afecciones pueden estar mediados total o parcialmente por un efecto
25 sobre el peso corporal o pueden ser independientes del mismo.

El efecto sinérgico de los agonistas duales de GluGLP-1 también puede dar como resultado la disminución de factores de riesgo cardiovascular tales como el colesterol y el LDL altos, que pueden ser completamente independientes de su efecto sobre el peso corporal.
30

La invención proporciona un compuesto de la invención para su uso en terapia, en particular para su uso en un método de tratamiento de una afección como se ha descrito anteriormente.

35 En un aspecto preferido, los compuestos que se describen pueden usarse en el tratamiento de la diabetes, especialmente la diabetes de tipo 2.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto como se describe, para su uso en el tratamiento de la diabetes, especialmente la diabetes de tipo 2 en un individuo que lo necesite.

40 En un aspecto no menos preferido, los compuestos que se describen pueden usarse para prevenir el aumento de peso o promover la pérdida de peso.

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto como se describe, para su uso en un método terapéutico para prevenir el aumento de peso o promover la pérdida de peso en un individuo que lo necesite.
45

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto como se describe, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención de obesidad, obesidad mórbida, obesidad mórbida antes de cirugía, inflamación vinculada a la obesidad, colecistopatía vinculada a obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad, prediabetes, diabetes, especialmente diabetes de tipo 2, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular en un individuo que lo necesite.
50

En otro aspecto, los compuestos descritos pueden usarse en un método para disminuir los niveles de LDL circulantes y/o aumentar la relación HDL/LDL.
55

En una realización específica, la presente invención proporciona un compuesto como se describe para su uso en un método terapéutico para disminuir los niveles de LDL circulantes y/o aumentar la relación HDL/LDL en un individuo que lo necesite.

60 Los compuestos descritos también pueden usarse en un método para disminuir los niveles de triglicéridos circulantes.

Composiciones farmacéuticas

65 Los compuestos de la presente invención pueden formularse como composiciones farmacéuticas preparadas para el almacenamiento o la administración. Una composición de este tipo normalmente comprende una cantidad

terapéuticamente eficaz de un compuesto de la invención, en la forma apropiada, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 La cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto de la presente invención dependerá de la vía de administración, del tipo de mamífero que se trata y de las características físicas del mamífero específico que se considera. Estos factores y su relación para determinar esta cantidad son bien conocidos por los facultativos expertos en medicina. Esta cantidad y el método de administración pueden adaptarse para conseguir una eficacia óptima y pueden depender de factores tales como el peso, la dieta, la medicación simultánea y otros factores, bien conocidos por los expertos en medicina. Los tamaños de dosificación y la pauta de dosificación más apropiados para su uso humano pueden estar guiados por los resultados obtenidos mediante la presente invención y pueden confirmarse en ensayos clínicos diseñados apropiadamente. Los compuestos de la presente invención pueden ser particularmente útiles para el tratamiento de seres humanos.

15 Pueden determinarse una dosificación eficaz y un protocolo de tratamiento por medios convencionales, comenzando con una dosis baja en animales de laboratorio y después aumentando la dosificación mientras se controlan los efectos y también variando sistemáticamente la pauta de dosificación. Un médico puede tener en cuenta numerosos factores cuando determina una dosificación óptima para un sujeto dado. Dichas consideraciones son conocidas por el experto.

20 La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos convencionales. Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso terapéutico son bien conocidos en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit, 1985). Por ejemplo, pueden usarse solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH ligeramente ácido o fisiológico. Los agentes tamponantes del pH pueden ser fosfato, citrato, acetato, tris/hidroximetil)aminometano (TRIS), ácido N-Tris(hidroximetil)metil-3-aminopropanosulfónico (TAPS), bicarbonato de amonio, dietanolamina, histidina, que es un tampón preferido, arginina, lisina o acetato o mezclas de los mismos. El término abarca adicionalmente cualquier agente enumerado en la Farmacopea de los EE.UU. para su uso en animales, incluyendo los seres humanos.

30 La expresión "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal de uno cualquiera de los compuestos de la invención. Las sales incluyen sales farmacéuticamente aceptables tales como sales de adición de ácido y sales básicas. Los ejemplos de sales de adición de ácido incluyen sales de clorhidrato, sales de citrato y sales de acetato. Los ejemplos de sales básicas incluyen sales donde el catión se selecciona entre metales alcalinos, tales como sodio y potasio, metales alcalinotérreos, tales como calcio y iones amonio $^+N(R^3)_3(R^4)$, donde R^3 y R^4 indican independientemente alquilo C_{1-6} opcionalmente sustituido, alqueno C_{2-6} opcionalmente sustituido, arilo opcionalmente sustituido o heteroarilo opcionalmente sustituido. Otros ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables se describen en "*Remington's Pharmaceutical Sciences*", 17ª edición. Ed. Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, EE.UU., 1985 y ediciones más recientes y en la *Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology*.

40 "Tratamiento" es un enfoque para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los propósitos de la presente invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, el alivio de síntomas, la disminución de la extensión de la enfermedad, la estabilización de la patología (es decir, que no empeore), el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o paliación del estado de la patología y la remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. "Tratamiento" también puede significar la prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología de un trastorno. En consecuencia, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas en ciertas realizaciones. Los que necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que ha de prevenirse el trastorno. Por tratamiento se entiende inhibir o reducir un aumento en la patología o los síntomas (por ejemplo, aumento de peso, hiperglucemia) cuando se compara con la ausencia de tratamiento y no significa necesariamente que implique el cese completo de la afección pertinente.

55 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en forma de dosificación unitaria. En dicha forma, la composición se divide en dosis unitarias que contienen cantidades apropiadas del componente activo. La forma de dosificación unitaria puede ser una preparación envasada, conteniendo el envase cantidades individuales de las preparaciones, por ejemplo, comprimidos, cápsulas y polvos envasados en viales o ampollas. La forma de dosificación unitaria también puede ser una cápsula, sello o comprimido en sí mismo, o puede ser el número apropiado de cualquiera de estas formas envasadas. Puede proporcionarse en forma inyectable de dosis única, por ejemplo, en forma de pluma. En ciertas realizaciones, las formas envasadas incluyen una etiqueta o prospecto con instrucciones de uso. Las composiciones pueden formularse para cualquier vía y medios de administración adecuados. Los vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen los utilizados en formulaciones adecuadas para la administración oral, rectal, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa, intradérmica y transdérmica). Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la

farmacia.

Los modos de administración subcutáneos o transdérmicos pueden ser particularmente adecuados para los compuestos que se describen en el presente documento.

5 Las composiciones de la invención pueden combinarse adicionalmente o unirse, por ejemplo, a través de interacciones covalentes, hidrófobas y electrostáticas, un vehículo farmacológico, sistema de entrega de fármaco y sistema de entrega de fármaco avanzado para potenciar adicionalmente la estabilidad del compuesto, aumentar la biodisponibilidad, aumentar la solubilidad, disminuir los efectos adversos, conseguir la cronoterapia bien conocida por los expertos en la materia y aumentar el cumplimiento del paciente o cualquier combinación de los mismos. Los ejemplos de vehículos, sistemas de entrega de fármacos y sistemas avanzados de entrega de fármacos incluyen, entre otras cosas, polímeros, por ejemplo, celulosa y derivados, polisacáridos, por ejemplo, dextrano y derivados, almidón y derivados, poli(alcohol vinílico), polímeros de acrilato y metacrilato, ácido poliláctico y poliglicólico y copolímeros de bloque de los mismos, polietilenglicoles, proteínas transportadoras, por ejemplo, albúmina, geles, por ejemplo, sistemas termogelificantes, por ejemplo, sistemas copoliméricos de bloque bien conocidos por los expertos en la materia, micelas, liposomas, microesferas, nanopartículas, cristales líquidos y dispersiones de los mismos, fase L2 y dispersiones de los mismos, bien conocidos por los expertos en la materia del comportamiento de fases en sistemas lípido-agua, micelas poliméricas, emulsiones múltiples, autoemulsionantes, automicroemulsionantes, ciclodextrinas y derivados de los mismos y dendrímeros.

Terapia de combinación

Un compuesto o composición de la invención puede administrarse como parte de una terapia de combinación con un agente para el tratamiento de la obesidad, la hipertensión, la dislipidemia o la diabetes.

En dichos casos, los dos agentes activos pueden administrarse juntos o por separado y como parte de la misma formulación farmacéutica o como formulaciones separadas.

Por tanto, un compuesto o composición de la invención puede usarse adicionalmente en combinación con un agente antiobesidad, incluyendo, pero no limitado a, un agonista del receptor 1 del péptido similar al glucagón, péptido YY o análogo del mismo, antagonista del receptor cannabinoide 1, inhibidor de lipasa, agonista del receptor 4 de melanocortina, antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina (sola o en combinación con topiramato), una combinación de inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y antagonista del receptor opioide (por ejemplo, una combinación de bupropión y naltrexona) o un agente serotoninérgico (por ejemplo, lorcaserina).

Un compuesto o composición de la invención puede usarse en combinación con un agente antihipertensivo, incluyendo, pero no limitado a, un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, bloqueante del receptor de angiotensina II, diuréticos, betabloqueante o bloqueante de canales de calcio.

Un compuesto o composición de la invención puede usarse en combinación con un agente antidislipidemia, incluyendo, pero no limitado a, una estatina, un fibrato, una niacina y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.

Adicionalmente, un compuesto o composición de la invención puede usarse en combinación con un agente antidiabético, incluyendo, pero no limitado a, una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o glinida (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, un Inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista de GLP-1 diferente, una insulina o un análogo de insulina. En una realización preferida, el compuesto o sal del mismo se usa en combinación con insulina o un análogo de insulina, inhibidor de DPP-IV, sulfonilurea o metformina, en particular sulfonilurea o metformina, para conseguir un control glucémico adecuado. Los ejemplos de análogos de insulina incluyen, pero no se limitan a Lantus, Novorapid, Humalog, Novomix y Actraphane HM, Levemir y Apidra.

Ejemplos

Ejemplo 1: Síntesis general de análogos de glucagón

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) se realizó en un sintetizador asistido por microondas usando una estrategia convencional de Fmoc en NMP sobre una resina de poliestireno (TentaGel S Ram). Se usó HATU como reactivo de acoplamiento junto con DIPEA como base. Se usó piperidina (al 20 % en NMP) para la desprotección. Pseudoprolinas: se usaron Fmoc-Phe-Thr(ψMe,Mepro)-OH y Fmoc-Asp-Ser(ψMe,Mepro)-OH (adquiridos de NovaBiochem) cuando correspondía.

Las abreviaturas empleadas son como se indica a continuación:

Boc: terc-butiloxycarbonilo
ivDde: 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)3-metil-butilo

	Dde:	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexilideno)-etilo
	DCM:	diclorometano
	DMF:	<i>N,N</i> -dimetilformamida
	DIPEA:	diisopropiletilamina
5	EDT:	1,2-etanoditiol
	EtOH:	etanol
	Et ₂ O:	dietil éter
	HATU:	<i>N</i> -óxido de hexafluorofosfato <i>N</i> -[(dimetilamino)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridin-1-ilmetilén]- <i>N</i> -metilmetanaminio
10	MeCN:	acetonitrilo
	NMP:	<i>N</i> -metilpirrolidona
	TFA:	ácido trifluoroacético
	TIS:	triisopropilsilano

15 **Escisión:**

El péptido en bruto se escindió de la resina por tratamiento con TFA/TIS/agua al 95/2,5/2,5 % (v/v) a temperatura ambiente (ta) durante 2 horas. La mayor parte del TFA se retiró a presión reducida y el péptido en bruto se precipitó y se lavó con dietiléter y se dejó secar hasta peso constante a temperatura ambiente.

20 Se sintetizaron los siguientes compuestos. Algunos representan compuestos de la invención. Otros proporcionan contexto útil.

Compuesto no.

1	H-HAQTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
2	H-H-NMeSer-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
3	H-H-Ac3c-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
4	H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
5	H-HSHGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
6	H-HAHGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
7	H-H-DAla-HGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
8	H-H-Ac3c-HGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
9	H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDS-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAHDFVEWLLSA-NH ₂
10	H-H-Abu-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
11	H-HAQTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
12	H-H-DAla-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
13	H-HPQTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
14	H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
15	H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
16	H-Y-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH ₂
17	H-H-Aib-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLEEE-NH ₂

25 La modificación K(Hexadecanoil-isoGlu) se describió anteriormente.

Ejemplo 2: Ensayos de eficacia del receptor de glucagón y del receptor de GLP-1

30 El ADNc que codifica ya sea el receptor de glucagón humano (Glucagón-R) (número de acceso principal P47871) o el receptor de péptido 1 similar al glucagón humano (GLP-1 R) (número de acceso principal P43220) se sintetizó y se clonó en un vector de expresión de mamífero que contenía un marcador de resistencia a zeocina.

35 Los vectores de expresión de mamíferos que codificaban el Glucagón-R o el GLP-1-R se transflectaron en células de ovario de hámster chino (CHO) mediante el método del método Attractene. Se obtuvieron clones de expresión estable por selección con Zeocina (25 µg/ml) tras una dilución limitada de células resistentes a la presión de selección. Los clones celulares que expresaban Glucagón-R y GLP-1-R se recogieron, se propagaron y sometieron a ensayo en los ensayos de eficacia de Glucagón-R y GLP-1-R como se describen a continuación. Se eligieron un clon que expresaba Glucagón-R y un clon que expresaba GLP-1-R para realizar el perfil de los compuestos.

40 Se sembraron células CHO que expresaban el Glucagón-R humano o GLP-1-R humano 24 horas antes del ensayo a 30.000 células por pocillo en placas de microtitulación de 96 pocillos en cultivo en 100 µl de medio de crecimiento. El día del análisis, el medio de crecimiento se retiró y las células se lavaron una vez con 200 µl de tampón de ensayo (Krebs-Ringerbuffer - KRBH). El tampón se retiró y las células se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente en 10 µl de KRBH (KRBH + HEPES 10 mM, NaHCO₃ 5 mM, BSA al 0,1 % (V/V)) con IBMX 0,1 mM en agua desionizada que contenía concentraciones crecientes de péptidos de ensayo. La reacción se detuvo mediante la adición de tampón de lisis (BSA al 0,1 % p/v, HEPES 5 mM, Tween-20 al 0,3 % v/v). Después de la lisis celular durante 10 minutos a temperatura ambiente, los lisados se transfirieron a placas de 384 pocillos y se añadieron 10 µl de mezcla de perla aceptora/donadora contenida en el kit de ensayo funcional de AMPc

AlphaScreen™. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, el contenido de AMPc se determinó aplicando el kit de ensayo funcional de AMPc AlphaScreen™ de Perkin-Elmer de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La CE₅₀ y las eficacias relativas en comparación con los compuestos de referencia (glucagón y GLP-1) se calcularon aplicando un ajuste de curva asistido por ordenador. La relación GLP-1/glucagón se calcula como se ha definido anteriormente. Véase la Tabla 1.

5

Tabla 1

Compuesto	CE ₅₀ de hGCGR en CHO-K1 [nM]	CE ₅₀ de hGLP-1R en CHO-K1 [nM]	Relación GLP-1/ Glucagón
1	0,23 nM	0,52 nM	2,26
2	0,24 nM	0,926 nM	3,83
3	0,62 nM	0,29 nM	0,47
4	0,12 nM	0,27 nM	2,59
5	0,12 nM	0,62 nM	2,25
6	0,83 nM	0,35 nM	0,75
7	0,60 nM	0,24 nM	0,58
8	1,82 nM	0,33 nM	0,13
9	0,20 nM	0,33 nM	1,65
10	0,10 nM	0,27 nM	2,7
11	0,69 nM	0,14 nM	0,11
12	1,27 nM	0,14 nM	0,11
13	3,19 nM	0,21 nM	0,07
14	18,34 nM	0,68 nM	0,04
15	0,10 nM	0,23 nM	2,3
16	0,20 nM	0,43 nM	2,15
17	0,08 nM	0,27 nM	3,38

Ejemplo 3: Actividad agonista sobre el receptor de GLP-1 endógeno

10

Se determinó la actividad agonista de los compuestos de ensayo en receptores de GLP-1 endógenos usando una estirpe celular de insulinoma murino. El AMPc intracelular se usó como indicador de la activación del receptor.

15

Las células se cultivaron durante 24 horas a una densidad de 10.000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos. Se retiró el medio y se añadieron 10 µl de tampón KRBH (NaCl 130 mM, KCl 3,6 mM, NaH₂PO₄ 0,5 mM, MgSO₄ 0,5 mM, CaCl₂ 1,5 mM) que contenía compuesto de ensayo o GLP-1 (a concentraciones crecientes de 0,1 pM a 100 nM) o disolvente control (DMSO al 0,1 % (v/v)) a los pocillos durante 15 minutos a una temperatura de 26 °C.

20

El contenido de AMPc celular se mide usando el kit de ensayo funcional de AMPc AlphaScreen (Perkin Elmer). La medición se realizó usando Envision (PerkinElmer) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Todas las mediciones se realizaron por cuadruplicado.

25

Los resultados se convirtieron en concentraciones de AMPc usando una curva patrón de AMPc preparada en tampón KRBH que contenía DMSO al 0,1 % (v/v). Las curvas de AMPc resultantes se representaron gráficamente como concentraciones absolutas de AMPc (nM) sobre logaritmo (concentración de compuesto de ensayo) y se analizaron usando el programa de ajuste de curvas XLfit.

30

Los parámetros calculados para describir tanto la potencia como la actividad agonista de cada compuesto de ensayo sobre los receptores de GLP-1 endógenos fueron:

pCE₅₀ (valor logarítmico negativo de CE₅₀, una concentración que da como resultado una elevación semimáxima de los niveles de AMPc, que refleja la potencia del compuesto de ensayo);

Control porcentual (% de CTL) (% de elevación de AMPc para cada concentración de compuesto de ensayo normalizada basándose en la respuesta máxima de AMPc inducida por GLP-1 (100 % de CTL)). Véase la Tabla 2.

35

Tabla 2.

Compuesto	CE ₅₀ [nM]
1	0,12 nM
2	0,52 nM
3	0,27 nM

(continuación)

Compuesto	CE ₅₀ [nM]
4	0,32 nM
5	0,35 nM
6	0,40 nM
7	0,30 nM
8	0,24 nM
9	0,21 nM
10	0,09 nM
11	0,29 nM
12	0,23 nM
13	0,14 nM
14	0,13 nM
15	0,59 nM
16	0,66 nM
17	0,21 nM

Ejemplo 4: Actividad agonista sobre el receptor de glucagón endógeno

5 Se determinó la actividad agonista de los compuestos de ensayo sobre el receptor de glucagón endógeno midiendo su efecto sobre la velocidad de síntesis de glucógeno en hepatocitos de rata primarios. Tras la activación del receptor de glucagón, se espera una inhibición de la velocidad de síntesis de glucógeno. La velocidad de síntesis de glucógeno se determinó contando la cantidad de glucosa marcada radiactivamente incorporada en las reservas celulares de glucógeno en un período de tiempo definido.

10 Se cultivaron hepatocitos de rata primarios a una densidad de 40.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos durante 24 horas a 37 °C y CO al 25 %.

15 El medio se descartó y las células se lavaron con PBS. Después, se añadieron a los pocillos 180 µl de tampón a base de KRBH que contenía BSA al 0,1 % y glucosa a una concentración de 22,5 mM, seguido del compuesto de ensayo y D-[U¹⁴C] glucosa 40 µCi/ml (20 µl cada uno). La incubación continuó durante 3 horas.

20 Al final del período de incubación, el tampón de incubación se aspiró y las células se lavaron una vez con PBS enfriado con hielo antes de la lisis por incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente con 100 µl de NaOH 1 mol/l.

25 Los lisados celulares se transfirieron a placas de filtro de 96 pocillos y el glucógeno precipitó mediante la incubación de las placas de filtro durante 120 min a 4 °C, seguido del lavado de las placas de filtro 4 veces con etanol enfriado con hielo (al 70 %). Los precipitados resultantes se filtraron a sequedad y se determinó la cantidad de ¹⁴C-glucosa incorporada usando un contador de centelleo Topcount de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

30 Los pocillos con controles de vehículo (DMSO al 0,1 % (v/v) en tampón KRBH) se incluyeron como referencia para la síntesis de glucógeno no inhibida (100 % de CTL). Se incluyeron pocillos sin D-[U¹⁴C] glucosa añadida como controles para la señal de fondo no específica (restados de todos los valores). Se usó péptido de glucagón endógeno como control positivo.

Todos los tratamientos se realizaron al menos por triplicado.

35 Los parámetros calculados para describir tanto la potencia como la actividad agonista de cada compuesto de ensayo en el receptor de glucagón endógeno fueron pCE₅₀ y % de CTL.

El % de CTL se determina calculando el porcentaje de RPM/pocillo en presencia del compuesto de ensayo en comparación con el RPM/pocillo del control de vehículo después de restar el RPM/pocillo de fondo:

$$40 \quad \frac{[\text{RPM/pocillo}(\text{basal}) - \text{RPM/pocillo}(\text{muestra})] * 100}{[\text{RPM/pocillo}(\text{basal}) - \text{RPM/pocillo}(\text{control})]}$$

Un activador del receptor de glucagón dará como resultado una inhibición de la velocidad de síntesis de glucógeno y dará valores de % de CTL entre el 0 % de CTL (inhibición completa) y el 100 % de CTL (inhibición no observable).

45 Las curvas de actividad resultantes se representaron gráficamente como recuentos absolutos (unidad: rpm/muestra) sobre logaritmo (concentración de compuesto de ensayo) y se analizaron usando el programa de ajuste de curvas XLfit.

El pCE_{50} (valor logarítmico negativo de CE_{50}) refleja la potencia del compuesto de ensayo.

Tabla 3.

Compuesto	CE_{50} [nM]
1	1,30 nM
2	5,40 nM
3	3,27 nM
4	0,37 nM
5	0,75 nM
6	0,87 nM
7	0,28 nM
8	1,18 nM
9	0,07 nM
10	2,75 nM
11	0,59 nM
12	0,23 nM
13	4,00 nM
14	0,06 nM
15	0,05 nM
16	0,16 nM
17	2,26 nM

- 5 Los términos CE_{50} y pCE_{50} citados en relación con la activación de GLP-1R igualmente podrían considerarse como Cl_{50} y pCl_{50} en relación con la síntesis de glucógeno.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que tiene la fórmula:



en donde

10 R^1 es H (es decir, hidrógeno), alquilo C_{1-4} , acetilo, formilo, benzoilo o trifluoroacetilo;
 R^2 es OH o NH_2 ;
 X es un péptido que tiene la secuencia:
 H-X2-X3-GTFTSDYSKYL-X15-X16-X17-X18-A-X20-DFI-X24-WLE-X28-A
 en donde:

15 X2 se selecciona entre Ac3c, Ac4c y Ac5c;
 X3 se selecciona entre Gln e His;
 X15 se selecciona entre Asp y Glu;
 X16 se selecciona entre Glu, Lis y Ψ ;
 X17 se selecciona entre Lys, Arg y Ψ ;
 20 X18 se selecciona entre Ala y Arg;
 X20 se selecciona entre Lys y Ψ ;
 X24 se selecciona entre Glu, Lys y Ψ ;
 X28 se selecciona entre Ser, Lys y Ψ ;

25 en donde cada Ψ es un resto seleccionado independiente entre Lys, Arg, Orn y Cys y en donde la cadena lateral de cada resto Ψ está conjugada con un sustituyente lipófilo;
 y en donde Z está ausente o es una secuencia de 1-20 unidades de aminoácidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Ala, Leu, Ser, Thr, Tyr, Cys, Glu, Lys, Arg, Dbu, Dpr y Orn; o una sal o un solvato de los mismos farmacéuticamente aceptables.

30

2. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido X tiene una secuencia seleccionada entre:

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDKRAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIKWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIKWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLEKA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEKA
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA y
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA

35 3. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 2, que se selecciona entre:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDKRAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA-NH₂

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIKWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIKWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLEKA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEKA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKAAKDFIEWLESA-NH₂ y
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEKRAKDFIEWLESA-NH₂

40

4. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido X tiene una secuencia seleccionada entre:

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLEΨA
 H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA y
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA

5 5. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4, que se selecciona entre:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDΨRAAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIΨWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIΨWLESA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIEWLEΨA-NH₂
 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAKDFIEWLEΨA-NH₂
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨAAKDFIEWLESA-NH₂ y
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDEΨRAKDFIEWLESA-NH₂

6. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 4 que es:

10 H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDERRAAKDFIΨWLESA-NH₂.

7. Un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde, cuando Ψ está presente, el sustituyente lipófilo tiene la fórmula Z¹, en donde Z¹ es un residuo lipófilo conjugado directamente con la cadena lateral del resto Ψ, o Z¹Z² donde Z¹ es un residuo lipófilo, Z² es un espaciador y Z¹ se conjuga con la cadena lateral del resto Ψ a través de Z².

8. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el componente aminoácido de Ψ es Lys.

9. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 8, en donde Ψ es Lys(Hexadecanoil-isoGlu).

10. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, que tiene la secuencia:

H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA o
 H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA

11. Un compuesto de acuerdo con la reivindicación 1, seleccionado entre:

H-H-Ac4c-QGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂ y
 H-H-Ac4c-HGTFTSDYSKYLDE-K(Hexadecanoil-isoGlu)-AAKDFIEWLESA-NH₂

12. Una sal farmacéuticamente aceptable de un compuesto de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 11.

13. Una composición que comprende un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en mezcla con un vehículo, por ejemplo, en donde la composición es una composición farmacéutica, y el vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

14. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en terapia.

15. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para su uso en:

- (i) un método terapéutico de prevención de aumento de peso o de promoción de pérdida de peso;
- (ii) un método terapéutico de disminución de los niveles circulantes de LDL y/o de aumento de la relación HDL/LDL; o

(iii) un método de prevención o tratamiento de obesidad, obesidad mórbida, obesidad mórbida antes de cirugía, inflamación vinculada a obesidad, colecistopatía vinculada a obesidad, apnea del sueño inducida por obesidad, diabetes, síndrome metabólico, hipertensión, dislipidemia aterogénica, aterosclerosis, arterioesclerosis, cardiopatía coronaria, arteriopatía periférica, ictus o enfermedad microvascular.

5 16. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable para su uso de acuerdo con la reivindicación 15, en donde el compuesto o la sal farmacéuticamente aceptable se administran como parte de una terapia de combinación junto con un agente para el tratamiento de la diabetes, la obesidad, la dislipidemia o la hipertensión.

10 17. Un compuesto o una sal farmacéuticamente aceptable para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde

15 (i) el agente para el tratamiento de la diabetes es una biguanida (por ejemplo, metformina), una sulfonilurea, una meglitinida o una glinida, (por ejemplo, nateglinida), un inhibidor de DPP-IV, un inhibidor de SGLT2, una glitazona, un agonista de GLP-1 diferente, una insulina o un análogo de insulina;

20 (ii) el agente para el tratamiento de la obesidad es un agonista del receptor 1 del péptido similar al glucagón, un agonista del receptor peptídico YY o un análogo del mismo, un antagonista del receptor cannabinoide 1, un inhibidor de lipasa, un agonista del receptor 4 de melanocortina, un antagonista del receptor 1 de la hormona concentradora de melanina, fentermina, una combinación de un inhibidor de la recaptación de norepinefrina/dopamina y un antagonista del receptor opioide (por ejemplo, una combinación de fentermina y topiramato), una combinación de bupropión y naltrexona, o un agente serotoninérgico;

(iii) en donde el agente para el tratamiento de la hipertensión es un inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, un bloqueante del receptor de angiotensina II, un diurético, un betabloqueante o un bloqueante de los canales de calcio; o

25 (iv) el agente para el tratamiento de la dislipidemia es una estatina, un fibrato, una niacina y/o un inhibidor de la absorción de colesterol.