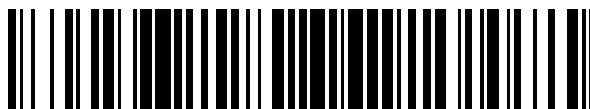


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 908**

51 Int. Cl.:

A61K 45/06 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 38/26 (2006.01)

C07K 14/605 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2016** **PCT/US2016/056969**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017** **WO17074715**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2016** **E 16785669 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019** **EP 3368061**

54 Título: **Agonistas del receptor de glucagón**

30 Prioridad:

26.10.2015 US 201562246199 P

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

12.03.2020

73 Titular/es:

ELANCO US INC. (100.0%)
2500 Innovation Way
Greenfield, IN 46140, US

72 Inventor/es:

COSKUN, TAMER y
ALSINA-FERNANDEZ, JORGE

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 747 908 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 del receptor de glucagón

5 La presente invención se refiere a compuestos con una duración de acción prolongada en el receptor de glucagón en comparación con el glucagón nativo. Específicamente se proporcionan agonistas del receptor de glucagón con modificaciones a la estructura del glucagón nativo introducidas para agonizar selectivamente el receptor de glucagón durante un período prolongado de tiempo. Los agonistas del receptor de glucagón pueden ser útiles en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar trastornos como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y/o la
 10 obesidad, o como monoterapias para tratar una variedad de trastornos, como la obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia y/o hipoglucemia nocturna, así como síndrome de hígado graso en vacas lecheras.

15 En las últimas décadas, la prevalencia de diabetes ha seguido aumentando. La DM2 es la forma más común de diabetes que representa aproximadamente el 90% de todas las diabetes. La DM2 se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre causados por la resistencia a la insulina. El estándar actual de atención para la DM2 incluye la dieta y el ejercicio, y el tratamiento con medicamentos orales y fármacos inyectables para reducir la glucosa, incluidas las terapias basadas en incretina, como los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1) y los inhibidores de la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Cuando el tratamiento con medicamentos orales y
 20 terapias basadas en incretina son insuficientes, se considera el tratamiento con insulina. Los pacientes cuya enfermedad ha progresado hasta el punto de que se requiere terapia con insulina generalmente comienzan con una inyección diaria única de insulina basal de acción prolongada, aunque en algunos casos se pueden incluir inyecciones de insulina de acción rápida a la hora de las comidas, según sea necesario.

25 A pesar de la disponibilidad de estas terapias, los niveles de glucosa en sangre en muchos pacientes con DM2 aún permanecen controlados de forma inadecuada. La diabetes no controlada conduce a varias afecciones que afectan la morbilidad y la mortalidad de los pacientes. Uno de los principales factores de riesgo para la DM2 es la obesidad. La mayoría de los pacientes con DM2 (~90%) tienen sobrepeso u obesidad. Está documentado que una disminución en la adiposidad corporal conducirá a una mejora en las comorbilidades asociadas a la obesidad, incluidas la hiperglucemia y los eventos cardiovasculares. Por lo tanto, se necesitan terapias efectivas en el control de la glucosa y la reducción de peso para un mejor manejo de la enfermedad.

Además, la prevalencia y la conciencia de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), que se refiere a un grupo de trastornos hepáticos asociados con la acumulación de grasa en el hígado, y la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), que es una forma severa de la NAFLD caracterizada por hallazgos histológicos como inflamación, lesión de hepatocitos y fibrosis, también ha seguido aumentando. La NASH es la enfermedad hepática más común en los países occidentales, y afecta entre el 3-5% de los adultos en los Estados Unidos. El tratamiento generalmente incluye cambios prescritos en la dieta y el ejercicio, y puede incluir cirugía bariátrica, pioglitazonas, estatinas, omega 3 y terapia con vitamina E (en el caso de pacientes con NASH no diabéticos) para reducir la
 35 grasa hepática, pero no hay agentes terapéuticos aprobados para abordar la inflamación y/o fibrosis asociada con NASH. Por lo tanto, se necesitan terapias adicionales.

Varios péptidos que están disponibles y/o en desarrollo como agentes terapéuticos, incluido el glucagón, se derivan del pre-proglucagón, que es un polipéptido que se procesa en el tejido para formar varios péptidos relacionados estructuralmente. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde con los aminoácidos 53 a 81 del pre-proglucagón, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 1). El glucagón ayuda a mantener el nivel de glucosa en la sangre al unirse y activar los receptores de glucagón en los hepatocitos, lo que hace que el hígado libere glucosa, almacenada en forma de glucógeno, a través de un procedimiento llamado glucogenólisis. A medida que las reservas de glucógeno se agotan, el glucagón estimula al hígado a sintetizar glucosa adicional por gluconeogénesis. Esta glucosa se libera en el torrente sanguíneo, evitando el desarrollo de hipoglucemia. La administración de glucagón es una terapia establecida para tratar la hipoglucemia aguda, y la administración de glucagón de emergencia puede restaurar los niveles normales de glucosa en cuestión de minutos después de la administración. Se ha descrito que ciertos análogos de glucagón exhiben una solubilidad y estabilidad mejoradas. Véase, por ejemplo, WO2015094875; WO2015094876; WO2015094878.

Otros péptidos derivados del pre-proglucagón incluyen GLP-1, péptido similar al glucagón tipo 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). GLP-1 es un péptido de 36 aminoácidos, cuyo fragmento biológicamente activo principal (GLP-1₇₋₃₆) se produce como un péptido amidado C-terminal de 30 aminoácidos que corresponde con los aminoácidos 98 a 127 del pre-proglucagón, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 2). Mientras que el glucagón estimula la liberación de glucosa para prevenir la hipoglucemia, GLP-1 (SEQ ID NO: 2) estimula la síntesis y secreción de insulina y se ha demostrado que previene la hiperglucemia en los diabéticos. Actualmente se encuentra disponible una variedad de análogos de GLP-1, que incluyen exenatida, liraglutida, albiglutida y dulaglutida.

OXM es un péptido de 37 aminoácidos compuesto por la secuencia completa de 29 aminoácidos de glucagón con una extensión octapeptídica de carboxilo terminal (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón y denominado "péptido interviniente 1" o IP-1), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTRNRNNIA (SEQ ID NO: 3). OXM activa los receptores de glucagón y GLP-1, con una potencia ligeramente mayor para el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1. Se han descrito análogos de OXM que tienen actividad dual del receptor de glucagón y receptor de GLP-1. Véase, por ejemplo, WO2011087672; WO2011087671.

Aunque no se deriva del pre-proglucagón, el polipéptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) es otro péptido que desempeña un papel fisiológico en la homeostasis de la glucosa al estimular la secreción de insulina de las células beta pancreáticas en presencia de glucosa. GIP es un péptido de 42 aminoácidos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ (SEQ ID NO: 4). Se ha descrito que ciertos análogos GIP exhiben actividad del receptor GIP y GLP-1. Véase, por ejemplo, WO2015067715; WO2011119657; WO2013164483.

Además, de forma similar a la actividad dual de OXM descrita anteriormente, se ha descrito que ciertos análogos de glucagón tienen actividad co-agonista tanto en el receptor de glucagón como en uno o más de los receptores GLP-1 o GIP. Por ejemplo, WO2011075393 y WO2012177444, pretenden describir análogos de glucagón que tienen actividad tanto en los receptores de glucagón como de GLP-1. De manera similar, el documento WO2013192130 pretende describir análogos de glucagón que también tienen actividad en el receptor GIP. Además, el documento WO2015067716 pretende describir análogos que tienen actividad agonista triple en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP.

A pesar de la variedad de péptidos y proteínas propuestos como DM2 y/o terapias contra la obesidad, las terapias que están actualmente disponibles y/o en desarrollo tienen limitaciones. En particular, aunque se puede afirmar que los agonistas duales o triples descritos anteriormente proporcionan las propiedades reductoras de glucosa de un agonista del receptor GLP-1 y/o del receptor GIP junto con los beneficios metabólicos de un agonista del receptor de glucagón, los niveles de actividad de dichos péptidos en cada uno de los diversos receptores que agonizan están fijos, lo que dificulta alcanzar un equilibrio ideal de activación del receptor para obtener, *in vivo*, alta eficacia con efectos secundarios mínimos. Y las terapias que no involucran agonismo del receptor de glucagón carecen de los beneficios metabólicos potenciales de dicho mecanismo de acción.

Aunque la administración concomitante de glucagón puede ser teóricamente capaz de atenuar tales limitaciones, los productos de glucagón disponibles actualmente no son prácticos para su uso en tales aplicaciones. En particular, la vida media plasmática del glucagón es inferior a una hora, por lo que no es práctico para el uso crónico, particularmente en realizaciones que involucran combinaciones con otras terapias disponibles y/o en desarrollo, ya que muchas de estas terapias se dosifican con poca frecuencia como una vez al día, y algunos se proponen para dosificar con poca frecuencia como una vez por semana. Además, el glucagón de tipo salvaje también tiene cierta actividad en el receptor GLP-1, lo que puede complicar los esfuerzos para lograr un equilibrio apropiado de la actividad del receptor de glucagón versus GLP-1 en terapias de combinación en las que el otro compuesto tiene su actividad de receptor de GLP-1 baja. Además, las características de solubilidad y estabilidad química y física de los productos de glucagón disponibles actualmente también son inapropiadas para el uso crónico en tales aplicaciones, y no permitirían la co-formulación con otros agentes terapéuticos.

Por lo tanto, existe la necesidad de agonistas del receptor de glucagón que tengan una duración de acción prolongada que permita la dosificación con poca frecuencia como una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana. También existe la necesidad de agonistas del receptor de glucagón que tengan una potente actividad en el receptor de glucagón y una alta selectividad para la actividad en el receptor de glucagón frente al receptor GLP-1. También existe la necesidad de agonistas de receptores de glucagón con características adecuadas para ser formulados conjuntamente con otros agentes terapéuticos. También existe la necesidad de agonistas del receptor de glucagón con características de solubilidad y estabilidad que permitan el almacenamiento y uso a largo plazo.

Los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención buscan satisfacer estas necesidades. Por consiguiente, la presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón con una duración de acción prolongada, lo que permite la dosificación con poca frecuencia como una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana. La presente invención proporciona a los agonistas del receptor de glucagón de una actividad óptima y selectiva en el receptor de glucagón en comparación, por ejemplo, con los receptores GLP-1 y/o GIP. La presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón que tienen características físicas y químicas adecuadas para uso crónico y co-formulación con otros tratamientos. La presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón que, cuando se usan en combinación con otros tratamientos para la diabetes, dan como resultado un mejor control de la glucosa, beneficios metabólicos, tales como la reducción del peso corporal y/o beneficios lipídicos, tales como la reducción de PCSK9, cuando se usan en combinación con otros tratamientos para la diabetes. En particular, las combinaciones de agonistas del receptor de glucagón de la presente invención con agonistas de GLP-1R o co-agonistas de GIP-GLP-1 tienen efectos

sinérgicos beneficiosos en medidas tales como pérdida de peso y composición corporal. La presente invención también busca proporcionar tratamientos eficaces para otros trastornos cuando se usa como monoterapia y/o en combinación con otras terapias, incluyendo obesidad, NAFLD, NASH, dislipidemia, trastorno metabólico, hiperinsulinemia y/o hipoglucemia nocturna.

Por consiguiente, una realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón que comprende la Fórmula I:



en la que

X_1 es Aib;
 X_2 es T o L;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil}]_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H})$, en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;
 X_5 es E o A;
 X_6 es T o E;
 X_7 está ausente o es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG; y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón que comprende una fórmula que consiste en la Fórmula I:



en la que

X_1 es Aib;
 X_2 es T o L;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil}]_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H})$, en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;
 X_5 es E o A;
 X_6 es T o E;
 X_7 está ausente o es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG; y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón que consiste en la Fórmula I:



en la que

X_1 es Aib;
 X_2 es T o L;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil}]_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H})$, en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;
 X_5 es E o A;
 X_6 es T o E;
 X_7 está ausente o es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG; y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que X_2 es T. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que X_2 es L.

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₅ es E. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₅ es A.

- 5 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₆ es T. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₆ es E.

- 10 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₇ es GPSSGAPPPS. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₇ es GPSSG. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que X₇ está ausente.

- 15 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que b es de 16 a 20. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que b es de 16 a 18. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que b es 16. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de cualquiera de las realizaciones anteriores en la que b es 18.

- 25 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 2; b es 16; X₅ es E; X₆ es T; y X₇ es GPSSGAPPPS; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6).

- En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 2; b es 18; X₅ es E; X₆ es T; X₇ es GPSSGAPPPS; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7).

- 30 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es L; a es 2; b es 16; X₅ es E; X₆ es T; y X₇ es GPSSGAPPPS; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 8).

- 35 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 2; b es 16; X₅ es E; X₆ es T; y X₇ es GPSSG; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 9).

- 40 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 2; b es 18; X₅ es E; X₆ es T; y X₇ es GPSSG; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 10).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 1; b es 16; X₅ es A; X₆ es E; y X₇ está ausente (SEQ ID NO: 11).

- 45 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 1; b es 18; X₅ es A; X₆ es E; y X₇ está ausente (SEQ ID NO: 12).

- 50 En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: a es 2; X₅ es E; X₆ es T; X₇ es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 16).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X₂ es T; a es 1; X₅ es A; X₆ es E; y X₇ está ausente (SEQ ID NO: 17).

- 55 En ciertas realizaciones, la actividad del agonista del receptor de glucagón en el receptor de glucagón es al menos 100 veces mayor que la actividad del agonista del receptor de glucagón en el receptor GLP-1.

- 60 También se divulga un procedimiento para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en DM2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención.

- 65 También se divulga un procedimiento para tratar el hígado graso que comprende administrar a un bovino que lo necesite, una cantidad eficaz del agonista del receptor de glucagón de la presente invención. En ciertas realizaciones, el bovino es una vaca lechera.

También se divulga un procedimiento para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en DM2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna, que comprende administrar a un paciente que lo necesite, una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales. En ciertas realizaciones, la enfermedad es DM2. En ciertas realizaciones, la enfermedad es la obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad es enfermedad del hígado graso. En ciertas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en agonistas de GLP-1R, co-agonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 ("DPP-4") e inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 ("SGLT2"). En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista GLP-1R. En ciertas realizaciones, el agonista GLP-1R es dulaglutida. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un co-agonista GIP-GLP-1. En ciertas realizaciones, el co-agonista GIP-GLP-1 tiene la estructura de la SEQ ID NO: 15. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de insulina.

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene efectos sinérgicos sobre la pérdida de peso y la composición corporal cuando se usa en combinación con un agente terapéutico adicional, tal como un agonista GLP-1R o un co-agonista GIP-GLP-1.

Otra realización de la presente invención proporciona el uso de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención en terapia. Otra realización de la presente invención proporciona el uso de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en DM2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna. En ciertas realizaciones, la enfermedad es DM2. En ciertas realizaciones, la enfermedad es la obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad es enfermedad del hígado graso. En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención para uso en el tratamiento del hígado graso en una vaca lechera.

Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención para uso en uso simultáneo, separado o secuencial en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para uso en terapia. En ciertas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en agonistas de GLP-1R, co-agonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de DPP-4 e inhibidores del cotransportador de sodio-glucosa tipo 2 ("SGLT2"). En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista GLP-1R. En ciertas realizaciones, el agonista GLP-1R es dulaglutida. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un co-agonista GIP-GLP-1. En ciertas realizaciones, el co-agonista GIP-GLP-1 tiene la estructura de la SEQ ID NO: 15.

También se describe el uso de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de DM2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna.

Otra realización de la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un agonista del receptor de glucagón de la presente invención y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica además comprende un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en agonistas de GLP-1R, co-agonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de DPP-4 e inhibidores de SGLT2. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista GLP-1R. En ciertas realizaciones, el agonista GLP-1R es dulaglutida. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un co-agonista GIP-GLP-1. En ciertas realizaciones, el co-agonista GIP-GLP-1 tiene la estructura de la SEQ ID NO: 15. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de insulina.

También se divulga un procedimiento para inducir una pérdida de peso no terapéutica que comprende la administración de una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención.

También se divulga un procedimiento para tratar el síndrome de hígado graso en un bovino, que comprende administrar a un bovino que lo necesite, una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención.

Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención para su uso en el tratamiento del síndrome de hígado graso en un bovino.

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "agonistas del receptor de glucagón" significa compuestos que comprenden la secuencia de aminoácidos del glucagón humano nativo (SEQ ID NO: 1), un análogo de

glucagón, un derivado de glucagón o una proteína de fusión de glucagón, que se unen y activan el receptor de glucagón, y mantener la actividad selectiva en el receptor de glucagón en relación con el receptor GLP-1, lo que resulta en un aumento en los niveles de glucosa sérica cuando se administra como monoterapia. Dichas características de unión y efectos farmacodinámicos se pueden medir utilizando procedimientos *in vitro* e *in vivo* conocidos, como los descritos en los estudios a continuación. Un análogo de glucagón es una molécula que tiene una modificación que incluye una o más sustituciones, deleciones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos del glucagón humano nativo (SEQ ID NO: 1). Un derivado de glucagón es una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos del glucagón humano nativo (SEQ ID NO: 1) o de un análogo de glucagón, pero además tiene al menos una modificación química de uno o más de sus grupos laterales de aminoácidos, átomos de α -carbono, grupo amino terminal o grupo ácido carboxílico terminal. Una proteína de fusión de glucagón es una proteína heteróloga que comprende glucagón, un análogo de glucagón o un derivado de glucagón y un segundo polipéptido, tal como una región Fc de inmunoglobulina.

Las actividades de los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención también son selectivas para el receptor de glucagón en relación con el receptor GLP-1. Cuando se usan en la presente memoria, los términos "selectivo ... en relación con", "selectividad" y "selectivo contra" se refieren a un compuesto que muestra una potencia 50, 100, 200, 250, 500 o 1000 veces mayor para el receptor de glucagón sobre el receptor GLP-1. Dicha selectividad se puede medir utilizando procedimientos *in vitro* conocidos, como los descritos en los estudios a continuación.

Los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención tienen perfiles de tiempo de acción prolongado que permiten la dosificación con poca frecuencia como una vez al día, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana. El perfil de acción temporal de un agonista del receptor de glucagón se puede medir utilizando procedimientos de prueba farmacocinéticos conocidos.

Los perfiles de de tiempo acción prolongado de los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención se logran mediante el uso de un resto de ácido graso conjugado con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral del aminoácido lisina en la posición 20. El ácido graso se conjuga con el grupo épsilon-amino de una cadena lateral de lisina a través de un ligador, que comprende [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ Glu)_a, en la que a es 1 o 2. El ácido graso y el ácido gamma-glutámico en el ligador actúan como aglutinantes de albúmina y proporcionan el potencial para generar compuestos de acción prolongada. El ácido graso conjugado con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral del aminoácido lisina en la posición 20 por medio del ligador comprende -CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que b es de 14 a 24. Por lo tanto, la estructura completa de ácido graso-ligador comprende ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γ Glu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24. Como se muestra en las estructuras químicas de los Ejemplos 1-7 a continuación, la primera unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo está unida al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina. La segunda unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo se une al grupo amino de la primera unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo. Luego, la primera unidad de γ Glu se une al grupo amino de la segunda unidad de [2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo a través del grupo γ -carboxilo de la cadena lateral. Cuando a = 2, la segunda unidad de γ Glu se une al grupo α -amino de la primera unidad de γ Glu a través del grupo γ -carboxilo de la cadena lateral. Por último, el ácido graso se une al grupo α -amino de la primera unidad (cuando a = 1) o segunda unidad (cuando a = 2) de γ Glu.

Los agonistas del receptor de glucagón de la invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas administradas por vías parenterales (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular o transdérmica). Dichas composiciones farmacéuticas y procedimientos para prepararlos son bien conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Remington: La ciencia y la práctica de la Farmacia) (D.B. Troy, editor, 21ª edición, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). La vía preferente de administración es la subcutánea.

Los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención pueden reaccionar con cualquiera de una serie de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. (Véase, por ejemplo, P. Stahl, et al. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use (Manual de sales farmacéuticas: propiedades, selección y uso), 2ª edición revisada (Wiley-VCH, 2011)). Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen sales de trifluoroacetato, clorhidrato y acetato.

Un beneficio particular proporcionado por la selectividad de los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención para el receptor de glucagón sobre el receptor GLP-1 es la capacidad de proporcionar opciones de tratamiento flexibles cuando los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención se administran en combinación con agentes terapéuticos adicionales, tales como la relación de actividad en el receptor de glucagón a la actividad en el otro receptor (p. ej., GLP-1, GIP y/o receptor de insulina). Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferentes, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de DM2 en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un agente terapéutico adicional. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del

grupo que consiste en un agonista GLP-1R, un co-agonista GIP-GLP-1 o un agonista del receptor de insulina.

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "agente(s) terapéutico(s) adicional(es)" significa otro(s) compuesto(s) que se sabe que tienen efectos terapéuticos beneficiosos, tales como tratamientos para DM2 y/u obesidad, que están actualmente disponibles y/o en desarrollo, incluyendo, por ejemplo, agonistas de GLP-1R, co-agonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de DPP-4 e inhibidores de SGLT2.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "en combinación con" significa la administración del agonista del receptor de glucagón de la presente invención de forma simultánea, secuencial o en una sola formulación combinada con uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "agonista GLP-1R" se refiere a un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEQ ID NO: 2), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un Proteína de fusión GLP-1, que mantiene la actividad en el receptor GLP-1. La actividad del receptor GLP-1 se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden la actividad de unión al receptor GLP-1 o la activación del receptor. Un análogo de GLP-1 es una molécula que tiene una modificación que incluye una o más sustituciones, delecciones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEQ ID NO: 2). Un derivado de GLP-1 es una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEQ ID NO: 2) o de un análogo de GLP-1, pero que además tiene al menos una modificación química de uno o más de sus aminoácidos grupos laterales, átomos de α -carbono, grupo amino terminal o grupo ácido carboxílico terminal. Una proteína de fusión GLP-1 es una proteína heteróloga que comprende GLP-1, un análogo de GLP-1 o un derivado de GLP-1 y un segundo polipéptido, tal como una región Fc de inmunoglobulina. Los agonistas de GLP-1R actualmente disponibles y/o en desarrollo incluyen exenatida, liraglutida, lixisenatida, albiglutida, dulaglutida y semaglutida. En ciertas realizaciones preferentes en las que se administra un agonista del receptor de glucagón de la presente invención en combinación con un agonista GLP-1R, el agonista GLP-1R es dulaglutida. Véase, por ejemplo, el documento US 7,452,966.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "co-agonista GIP-GLP-1" se refiere a un compuesto que tiene actividad tanto en los receptores de GIP como de GLP-1. La actividad del receptor GIP y del receptor GLP-1 se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden la actividad de unión al receptor GIP y/o la activación del receptor GLP-1. Aunque actualmente no hay co-agonistas de GIP-GLP-1 disponibles como tratamientos de DM2, se ha descrito que múltiples análogos GIP muestran actividad del receptor GIP y GLP-1, véase, por ejemplo, WO2013164483; WO2011119657.

En ciertas realizaciones preferentes en las que un agonista del receptor de glucagón de la presente invención se administra en combinación con un co-agonista GIP-GLP-1, el co-agonista GIP-GLP-1 tiene la siguiente estructura: YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS; en la que X₁ es Aib; X₂ es Aib; X₃ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂(γ Glu)_a-CO(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 1 o 2 y b es 10 a 20; X₄ es Phe o 1-naftilalanina (1-Na1); y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 13), o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones preferentes a es 2, b es 18; X₄ es 1-Na1; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal. (SEQ ID NO: 14). En ciertas realizaciones preferentes a es 1, b es 18; X₄ es Phe; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal. (SEQ ID NO: 15). Tales co-agonistas de GIP-GLP-1 se pueden preparar usando técnicas tales como las que se pueden usar para preparar agonistas del receptor de glucagón de la presente invención, como se describe a continuación en los ejemplos de Síntesis de Péptidos.

Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "agonista del receptor de insulina" se refiere a insulina humana, o análogos o derivados de la misma, o cualquier otra proteína que sea capaz de unirse y activar el receptor de insulina. La actividad del receptor de insulina puede medirse mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden la actividad de unión al receptor de insulina o la activación del receptor. Un análogo de insulina es una molécula que tiene una modificación que incluye una o más sustituciones, delecciones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la insulina humana nativa, cuya estructura es bien conocida. Un derivado de insulina es una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de la insulina humana nativa, o un análogo de la misma, pero que además tiene al menos una modificación química de uno o más de sus grupos laterales de aminoácidos, átomos de α -carbono,

grupo amino terminal o grupo terminal de ácido carboxílico. Una proteína de fusión de insulina es una proteína heteróloga que comprende insulina, un análogo de insulina o una porción derivada de insulina y un segundo polipéptido. Aunque se puede considerar cualquier agonista del receptor de insulina para su uso en realizaciones en las que un agonista del receptor de glucagón de la presente invención se administra en combinación con un

5 agonista del receptor de insulina, los agonistas del receptor de insulina preferentes son aquellos que tienen una duración de acción basal o prolongada. Los agonistas de los receptores de insulina disponibles actualmente con actividad basal incluyen insulina glargina, insulina detemir e insulina degludec, cada una de las cuales está indicada para la administración una vez al día.

10 También se divulga un procedimiento para el tratamiento de DM2 en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

15 También se divulga un procedimiento para el tratamiento de la obesidad en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 También se divulga un procedimiento para el tratamiento de la enfermedad del hígado graso en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

25 También se divulga un procedimiento para el tratamiento de NASH en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 También se divulga un procedimiento de tratamiento de DM2 en un paciente que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una cantidad eficaz de un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, como agonistas de GLP-1R, co-agonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de DPP-4 e inhibidores de SGLT2.

35 Cuando se usa en la presente memoria, la expresión "paciente que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano o un bovino, con una enfermedad o afección que requiere tratamiento, que incluye, por ejemplo, DM2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH y/o síndrome metabólico.

40 Cuando se usa en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis de agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Una persona experta en la técnica puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Al determinar la cantidad eficaz para un paciente, se consideran varios factores, que incluyen, entre otros: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad o trastorno específico involucrado; el grado de participación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el agonista particular del receptor de glucagón administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicamentos concomitantes; y otras circunstancias relevantes.

50 Ciertos agonistas del receptor de glucagón de la presente invención son generalmente eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosis para una administración semanal pueden estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 30 mg por persona por semana. Los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención pueden dosificarse diariamente, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana. Se prefiere la administración una vez a la semana.

55 Como se usa en la presente memoria, el término "tratamiento" o "tratar" incluye restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de un síntoma o trastorno existente.

60 Las secuencias de aminoácidos de la presente invención contienen los códigos estándar de una letra o tres letras para los veinte aminoácidos naturales. Además, "Aib" es ácido alfa amino isobutírico. La presente invención también abarca nuevos intermedios y procedimientos útiles para la síntesis de agonistas de los receptores de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos. Los intermedios y los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención pueden prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. En particular, el procedimiento que usa síntesis química se ilustra en los ejemplos a continuación. Las etapas sintéticas específicas para cada una de las vías descritas se pueden combinar de diferentes maneras para preparar los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención. Los reactivos y los materiales de partida están fácilmente disponibles para un experto en la técnica.

65

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitantes.

5 Síntesis de péptidos

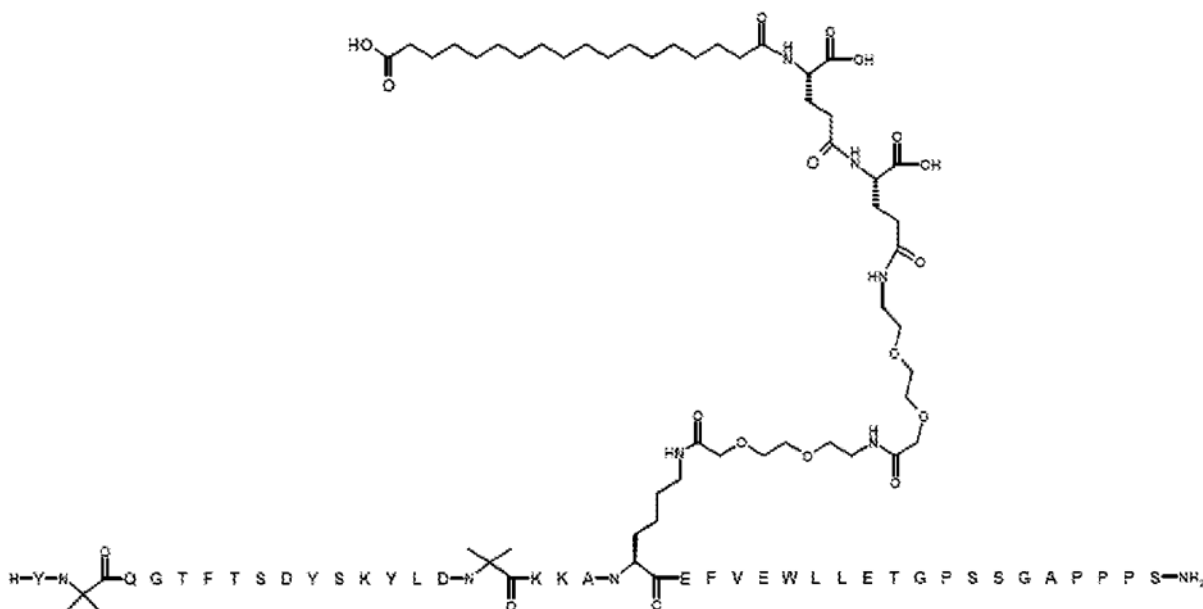
Ejemplo 1

El ejemplo 1 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que X₁ es Aib; X₂ es T; X₃ es Aib; X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 16; X₅ es E; X₆ es T; X₇ es GPSSGAPPPS; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 1 usando los códigos estándar de aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



El péptido del Ejemplo 1 se genera mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando una estrategia Fmoc/t-Bu llevada a cabo en un sintetizador de péptidos automatizado Symphony (PTI Protein Technologies Inc.) a partir de la resina RAPP AM-Rink Amide y con acoplamientos utilizando 6 equivalentes de aminoácidos activados con diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (relación molar 1:1:1) en dimetilformamida (DMF) durante 90 minutos a 25 °C.

Acoplamientos extendidos para Pro31 (4h), Trp25 (4h), Glu24 (4h), Val23 (10h), Glu21 (4h), Aib16 (4h), Asp15 (4h), Thr7 (4h), Thr5 (4h), Gly4 (4h), Gln3 (4h) y Aib2 (24h) son necesarios para mejorar la calidad del péptido crudo. Se utiliza un bloque de construcción Fmoc-Lys(Alloc)-OH para el acoplamiento Lys20 (grupo protector ortogonal) para permitir la unión específica del sitio del resto de ácido graso más adelante en el procedimiento sintético. El residuo N-terminal se incorpora como Boc-Tyr(tBu)-OH usando protocolos DIC-HOBt como se describió anteriormente (acoplamiento de 24 h).

Después de terminar el alargamiento de la resina peptídica descrita anteriormente, el grupo protector Alloc presente en Lys20 se elimina usando cantidades catalíticas de Pd(PPh₃)₄ en presencia de PhSiH₃ como depurador. Ciclos adicionales de acoplamiento/desprotección utilizando una estrategia Fmoc/t-Bu para extender la cadena lateral Lys20 implican Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH (Catálogo ChemPep # 280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (Catálogo ChemPep # 100703) y HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. En todos los acoplamientos, se utilizan 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4 horas a 25 °C.

La escisión concomitante de la resina y la eliminación del grupo protector de la cadena lateral se llevan a cabo en una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano: 1,2-etanodiol: agua: tioanisol 90:4:2:2:2 (v/v) durante 2 h a 25 °C seguido de precipitación con éter frío. El péptido crudo se purifica a > 99% de pureza

(rendimiento purificado de 15-20%) mediante cromatografía HPLC de fase inversa con gradiente de agua/acetonitrilo (que contiene 0,05% v/v TFA) en una columna C18, en la que las fracciones adecuadas se agrupan y liofilizan, dando como resultado una sal de TFA.

- 5 En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente, la pureza del Ejemplo 1 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3 = 1713,6$; $M+3H^+/3$ calculado = 1714,3; observado: $M+4H^+/4 = 1285,7$; $M+4H^+/4$ calculado = 1285,9).

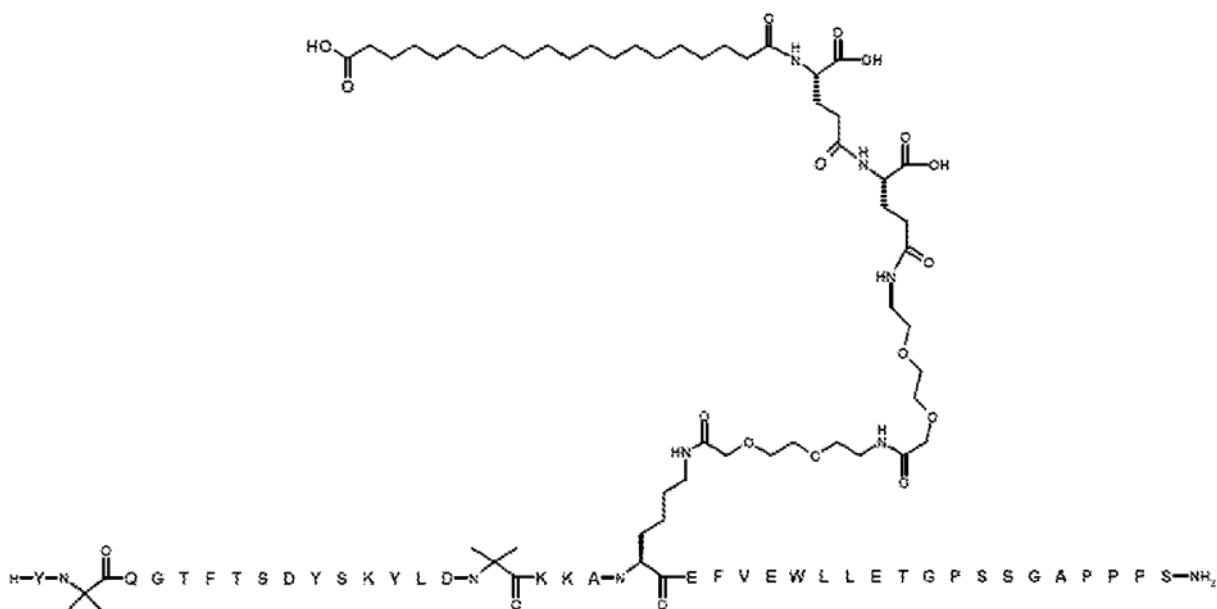
Ejemplo 2

El ejemplo 2 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en la que: X_1 es Aib, X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; a es 2; b es 18; X_5 es E; X_6 es T; X_7 es GPSSGAPPPS; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 2 usando los códigos estándar de aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



El péptido según el Ejemplo 2 se sintetiza de manera similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 1. $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_{18}\text{-COOtBu}$ se incorpora usando 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4 horas a 25 °C.

En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente para el Ejemplo 1, la pureza del Ejemplo 2 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3 = 1723,2$; $M+3H^+/3$ calculado = 1723,6; observado: $M+4H^+/4 = 1292,9$; $M+4H^+/4$ calculado = 1293,0).

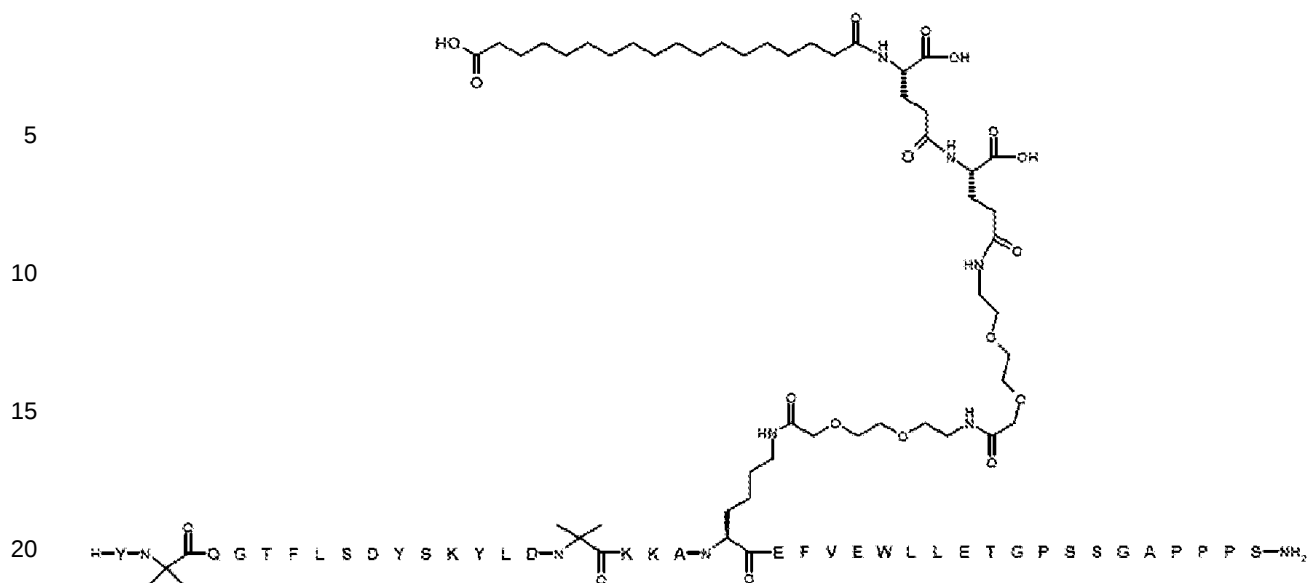
Ejemplo 3

El ejemplo 3 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en la que: X_1 es Aib; X_2 es L; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; a es 2; b es 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSGAPPPS; y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 8).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 3 usando los códigos estándar de aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



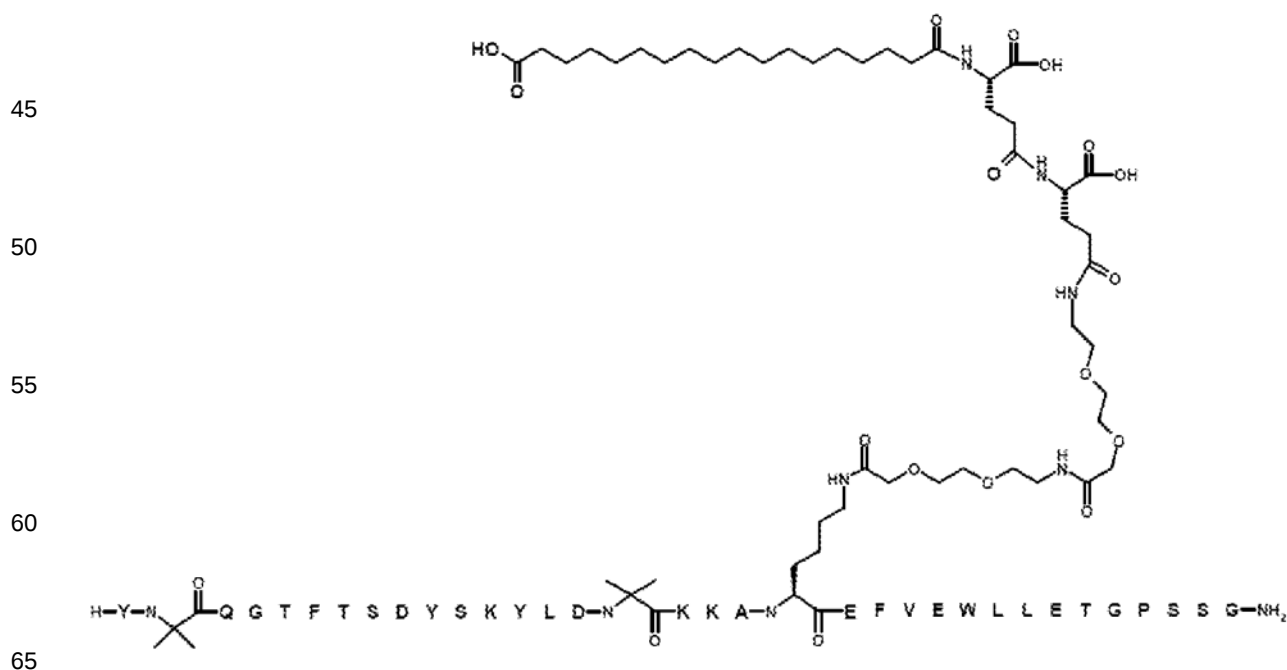
El péptido según el Ejemplo 3 se sintetiza de manera similar a la descrita anteriormente para el Ejemplo 1.

25 En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente para el Ejemplo 1, la pureza del Ejemplo 3 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3 = 1717,4$; $M+3H^+/3$ calculado = 1718,3; observado: $M+4H^+/4 = 1288,3$; $M+4H^+/4$ calculado = 1289,0).

Ejemplo 4

30 El ejemplo 4 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:
 $YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$
 en la que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo
 35 épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; a es 2; b es
 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal
 (SEQ ID NO: 9).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 4 usando los códigos estándar de
 40 aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos
 residuos de aminoácidos se han expandido:



El péptido según el Ejemplo 4 se sintetiza de manera similar a la descrita anteriormente para el Ejemplo 1.

En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente para el Ejemplo 1, la pureza del Ejemplo 4 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3 = 1563,7$; $M+3H^+/3$ calculado = 1564,4; observado: $M+4H^+/4 = 1172,9$; $M+4H^+/4$ calculado = 1173,6).

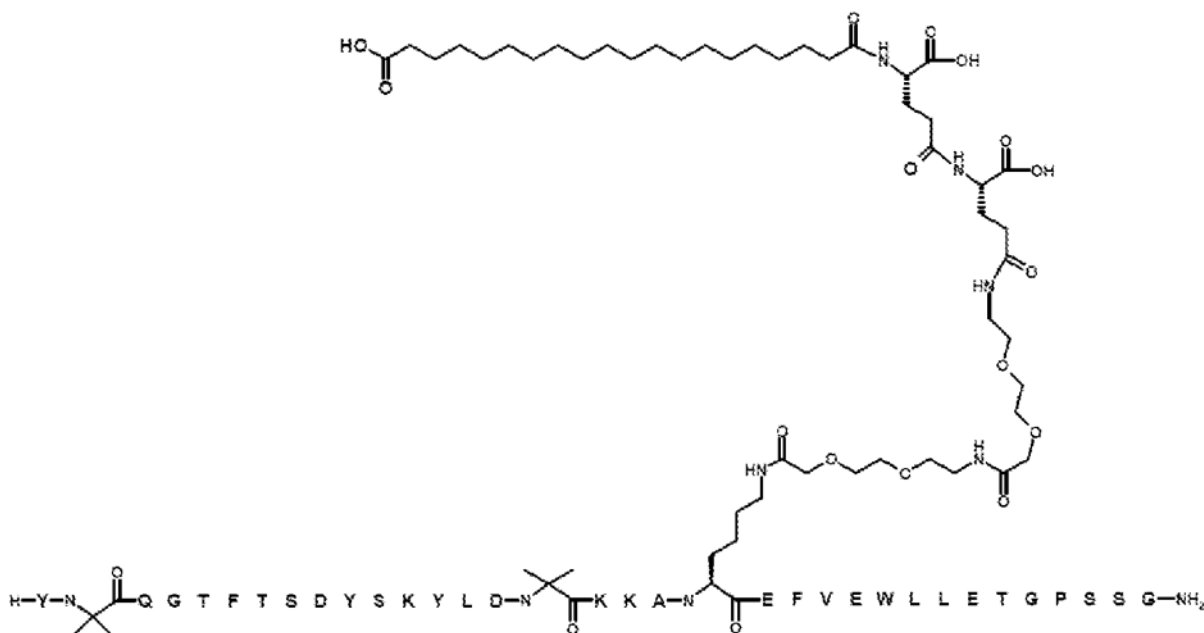
Ejemplo 5

El ejemplo 5 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que X₁ es Aib; X₂ es T; X₃ es Aib; X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a es 2; b es 18; X₅ es E; X₆ es T; y X₇ es GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 10).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 5 usando los códigos estándar de aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



El péptido según el Ejemplo 5 se sintetiza de manera similar a la descrita anteriormente para el Ejemplo 1.

En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente para los Ejemplos 1 y 2, la pureza del Ejemplo 5 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3 = 1572,9$; $M+3H^+/3$ calculado = 1573,8; observado: $M+4H^+/4 = 1179,8$; $M+4H^+/4$ calculado = 1180,6).

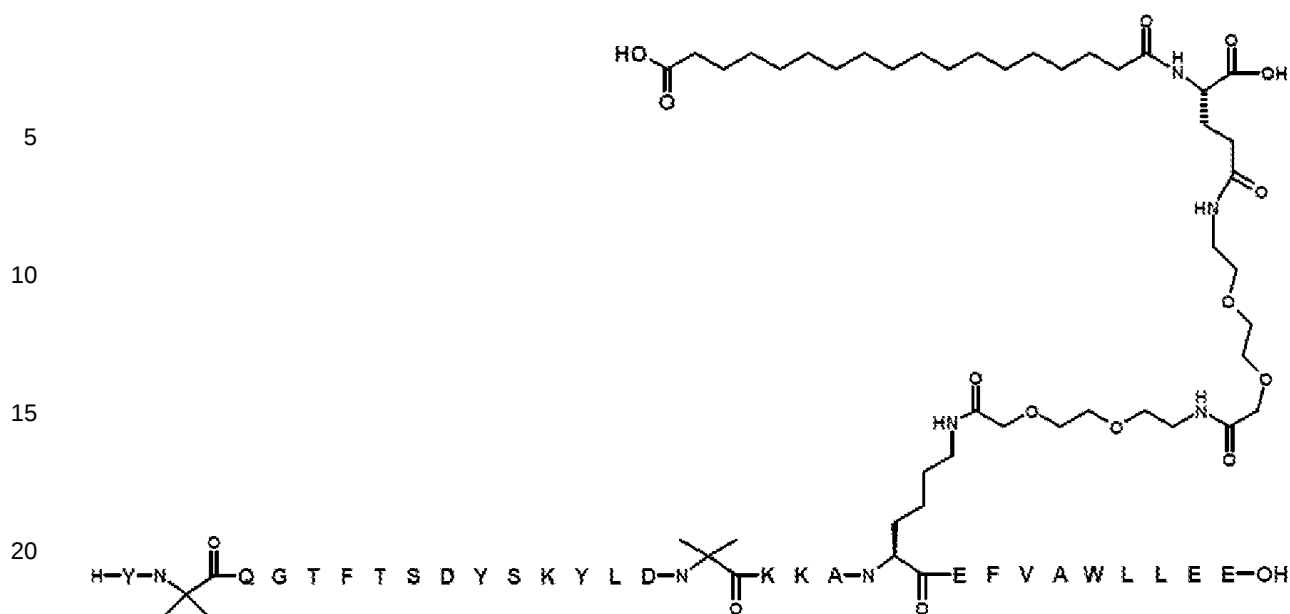
Ejemplo 6

El ejemplo 6 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que X₁ es Aib; X₂ es T; X₃ es Aib; X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H; a es 1; b es 16; X₅ es A; X₆ es E; y X₇ está ausente; y el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal (SEQ ID NO: 11).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 6 usando los códigos estándar de aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



El péptido según el Ejemplo 6 se genera mediante síntesis de péptidos en fase sólida usando una estrategia Fmoc/t-Bu llevada a cabo en un sintetizador de péptidos automatizado Symphony (PTI Protein Technologies Inc.) a partir de resina Fmoc-L-Glu(OtBu)-Wang (Catálogo NovaBiochem artículo # 856008; carga inicial 0,51 mmol/g) y con acoplamientos usando 6 equivalentes de aminoácidos activados con diisopropilcarbodiimida (DIC) e hidroxibenzotriazol (HOBt) (relación molar 1:1:1) en dimetilformamida (DMF) durante 90 minutos a 25 °C.

Acoplamientos extendidos para Trp25 (4h), Ala24 (4h), Val23 (10h), Glu21 (4h), Aib16 (4h), Asp15 (4h), Thr7 (4h), Thr5 (4h), Gln3 (4h) y Aib2 (24h) son necesarios para mejorar la calidad del péptido crudo. Se usa un bloque de construcción Fmoc-Lys(Alloc)-OH para el acoplamiento Lys20 (grupo protector ortogonal) para permitir la unión específica del sitio del resto de ácido graso más adelante en el procedimiento sintético (tiempo de acoplamiento 4h). El residuo N-terminal se incorpora como Boc-Tyr(tBu)-OH usando protocolos DIC-HOBt como se describió anteriormente (acoplamiento de 24 h).

Después de terminar el alargamiento de la resina peptídica descrita anteriormente, el grupo protector Alloc presente en Lys20 se elimina usando cantidades catalíticas de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ en presencia de PhSiH_3 como depurador. Ciclos adicionales de acoplamiento/desprotección utilizando una estrategia de Fmoc/t-Bu para extender la cadena lateral Lys20 involucrados Fmoc-NH-PEG₂-CH₂COOH (Catálogo ChemPep # 280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (Catálogo ChemPep # 100703) y HOOC-(CH₂)₁₆-COOtBu. En todos los acoplamientos, se utilizan 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4 horas a 25 °C.

La escisión concomitante de la resina y la eliminación del grupo protector de la cadena lateral se llevan a cabo en una solución que contiene ácido trifluoroacético (TFA): triisopropilsilano: 1,2-etanodiol: agua: tioanisol 90:4:2:2:2 (v/v) durante 2 h a 25 °C seguido de precipitación con éter frío. El péptido crudo se purifica a > 99% de pureza (rendimiento purificado de 15-20%) por cromatografía HPLC de fase inversa con gradiente de agua/acetonitrilo (que contiene 0,05% v/v TFA) en una columna C18, en la que las fracciones adecuadas se agrupan y se liofilizan.

En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente, la pureza del Ejemplo 6 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $\text{M}+3\text{H}^+/3 = 1382,7$; $\text{M}+3\text{H}^+/3$ calculado = 1383,3; observado: $\text{M}+4\text{H}^+/4 = 1036,6$; $\text{M}+4\text{H}^+/4$ calculado = 1037,7).

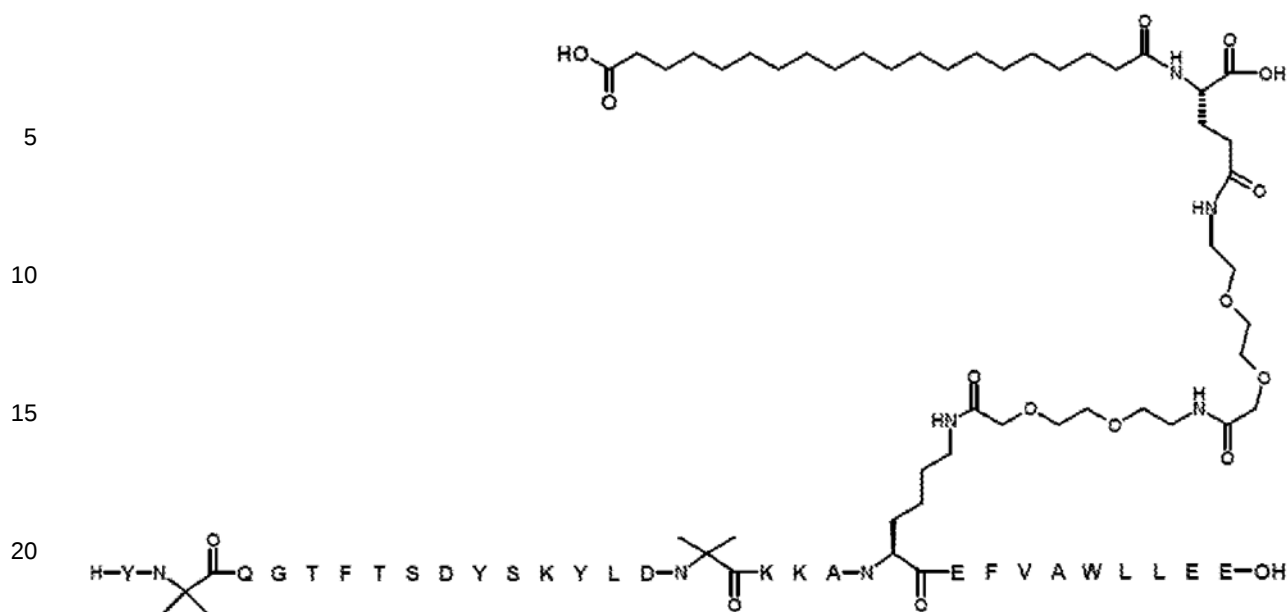
Ejemplo 7

El ejemplo 7 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

$\text{YX}_1\text{QGTFX}_2\text{SDYSKYLDX}_3\text{KKAX}_4\text{EFVX}_5\text{WLLEX}_6\text{X}_7$

en la que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $[(2-(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi})\text{-acetil}]_2\text{-(}\gamma\text{Glu)}_a\text{-CO-(CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}$; a es 1; b es 18; X_5 es A; X_6 es E; y X_7 está ausente; y el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal (SEQ ID NO: 12).

A continuación, se muestra una representación de la estructura del Ejemplo 7 usando los códigos estándar de aminoácidos de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib16 y K20, en la que las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



El péptido según el Ejemplo 7 se sintetiza de forma similar a la descrita anteriormente en el Ejemplo 6. HOOC-(CH₂)₁₈-COOtBu se incorpora usando 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4 horas a 25 °C.

En una síntesis realizada esencialmente como se describió anteriormente en el Ejemplo 6, la pureza del Ejemplo 7 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: M+3H⁺/3 = 1391,8; M+3H⁺/3 calculado = 1392,6; observado: M+4H⁺/4 = 1044,3; M+4H⁺/4 calculado = 1044,7).

Función in vitro

Afinidad de unión

La afinidad de unión de los péptidos de los Ejemplos 1-7 se determina para el receptor de glucagón humano recombinante (hGcg-R), el receptor de glucagón de ratón (mGcg-R) y el receptor de glucagón de rata (rGcg-R). Los ensayos de unión competitiva con radioligandos que utilizan procedimientos de ensayo de proximidad de centelleo (SPA) y membranas preparadas a partir de células 293HEK transfectadas de forma estable que sobreexpresan hGcg-R, mGcg-R o rGcg-R se realizan para determinar las constantes de disociación de equilibrio (K_i) para los péptidos de los Ejemplos 1-7. Los protocolos y resultados experimentales se describen a continuación.

El ensayo de unión al receptor de Gcg humano utiliza hGcg-R clonado (Lok, S, et al., Gene 140 (2), 203-209 (1994)), aislado de células 293HEK que sobreexpresan el hGcg-R recombinante. El ADNc de hGcg-R se subclona en el plásmido de expresión pHd (expresión transactivada de la proteína C humana recombinante completamente carboxilada gamma, un factor antitrombótico. Grinnell, BW, et al., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y se selecciona con 200 µg/ml de higromicina.

El ensayo de unión al receptor de Gcg de ratón utiliza receptor de glucagón de ratón clonado (mGcgR) (Burcelin R, Li J, Charron MJ. Gene 164 (2), 305-10 (1995) GenBank: L38613) aislado de membranas 293HEK. El ADNc de mGcgR se subclona en el plásmido de expresión pcDNA3.1 (Promega)-ZeoR. Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y se selecciona una línea clonal usando 100 µg/ml de Zeocin.

El ensayo de unión al receptor de Gcg de rata utiliza receptor de glucagón de rata clonado (rGcg-R) (Svoboda, M, Ciccarelli, E, Tastenoy, M, Robberecht, P, Christophe, J. Un constructo de ADNc que permite la expresión de receptores de glucagón hepático de rata. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1), 135-142 (1993), GenBank: L04796) en membranas aisladas de células 293HEK que expresan transitoriamente rGcg-R. El ADNc de rGcg-R se subclona en el plásmido de expresión pcDNA3.1 (Promega)-ZeoR. Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y se expresa transitoriamente durante 48 horas.

Las membranas plasmáticas brutas se preparan usando células de cultivo adherente. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 50 mM, pH 7,5 e inhibidores de proteasa Roche Complete™ con EDTA. La suspensión celular se interrumpe usando un homogeneizador Potter-Elvehjem de vidrio equipado con un mortero de Teflón® para 25 golpes. El homogeneizado se centrifuga a 4 °C a 1100 × g durante 10 minutos. El sobrenadante se recoge y almacena en hielo mientras el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se

vuelve a homogeneizar. La mezcla se centrifuga a $1100 \times g$ durante 10 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante y se centrifuga a $35000 \times g$ durante 1 hora a 4°C . El sedimento de membrana se resuspende en un tampón de homogeneización que contiene inhibidores de proteasa, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se almacena como alícuotas en un congelador a -80°C hasta su uso.

Gcg se radioyoda por procedimiento de I-125-lactoperoxidasa y se purifica por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer (NEX207). La actividad específica es 2200 Ci/mmol . La determinación de K_D se realiza mediante competencia homóloga o análisis de unión de saturación. La K_D para el Gcg-R humano se estima en $3,92 \text{ nM}$ y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos probados en el ensayo de hGcg-R. Se estima que la K_D para Gcg-R de ratón es de $3,52 \text{ nM}$ y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos probados en el ensayo de mGcg-R. Se estima que la K_D para Gcg-R de rata es $21,4 \text{ nM}$ y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos probados en el ensayo de rGcg-R.

El ensayo de unión al receptor se lleva a cabo utilizando un formato de Ensayo de Proximidad de Centelleo (SPA) con perlas de aglutinina de germen de trigo (WGA) (Perkin Elmer). El tampón de unión contiene ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-metanosulfónico (HEPES) 25 mM , $\text{pH } 7,4$, CaCl_2 $2,5 \text{ mM}$, MgCl_2 1 mM , $0,1\%$ (p/v) de bacitracina (Affymetrix), $0,003\%$ (p/v) monolaurato de polioxietilensorbitano (TWEEN®-20) e inhibidores de la proteasa Roche Complete™ sin EDTA. Se disuelve Gcg (Eli Lilly and Company) en DMSO a $3,48 \text{ mg/ml}$ (1 mM) y se almacena congelado a -20°C en alícuotas de $100 \mu\text{l}$. La alícuota de Gcg se diluye y se usa en ensayos de unión en una hora. Los análogos de péptidos se disuelven en DMSO y se diluyen 3 veces en serie en DMSO al 100% . A continuación, se transfieren $5 \mu\text{l}$ de compuesto diluido en serie o DMSO a placas de ensayo de fondo transparente Corning® 3632 que contienen $45 \mu\text{l}$ de tampón de unión al ensayo o control de Gcg sin marcar (NSB a $1 \mu\text{M}$ final). Luego, $50 \mu\text{l}$ de hGcg-R ($1,5 \mu\text{g/pocillo}$), mGcg-R ($6,47 \mu\text{g/pocillo}$) o membranas rGcg-R ($1,5 \mu\text{g/pocillo}$), $50 \mu\text{l}$ I-125 Gcg ($0,15 \text{ nM}$ final en reacción), y se agregan $50 \mu\text{l}$ de perlas WGA ($150 \mu\text{g/pocillo}$), las placas se sellan y se mezclan en un agitador de placas (ajuste 6) durante 1 minuto. Las placas se leen con un contador de centelleo PerkinElmer Trilux MicroBeta® después de 12 horas de reposo a temperatura ambiente. Los resultados se calculan como un porcentaje de la unión específica de I-125-Gcg en presencia de compuesto. La concentración absoluta de IC_{50} del compuesto se deriva por regresión no lineal del porcentaje de unión específica de I-125-Gcg frente a la concentración de compuesto agregado. La concentración de IC_{50} se convierte en K_i utilizando la ecuación de Cheng-Prusoff (Cheng, Y., Prusoff, W. H., Biochem. Pharmacol. 22, 3099-3108, (1973)).

Los péptidos K_i de los Ejemplos 1-7 y Gcg humano en hGcg-R, mGcg-R y rGcg-R se proporcionan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1

	hGcg-R K_i , $\text{nM} \pm \text{SEM}$, (n)	mGcg-R K_i , $\text{nM} \pm \text{SEM}$, (n)	rGcg-R K_i , $\text{nM} \pm \text{SEM}$, (n)
Ejemplo 1	$2,04 \pm 1,02$ (n=2)	$1,92 \pm 0,71$ (n=2)	$9,78 \pm 0,22$ (n=2)
Ejemplo 2	$1,07 \pm 0,16$ (n=2)	$0,991 \pm 0,066$ (n=2)	$5,59 \pm 0,24$ (n=2)
Ejemplo 3	$0,2876 \pm 0,171$ (n=2)	$0,174$ (n=1)	$1,56 \pm 0,13$ (n=2)
Ejemplo 4	$0,738$ (n=1)	$0,774$ (n=1)	$5,86$ (n=1)
Ejemplo 5	$1,59$ (n=1)	$1,58$ (n=1)	$4,36$ (n=1)
Ejemplo 6	$0,316$ (n=1)	$0,123$ (n=1)	$0,98$ (n=1)
Ejemplo 7	$0,673$ (n=1)	$0,753$ (n=1)	$1,38$ (n=1)
Glucagón humano	$3,64 \pm 0,91$ (n=3)	$2,41 \pm 0,22$ (n=3)	$23,3 \pm 1,7$ (n=3)

Estos datos indican que los agonistas de receptores de glucagón de la presente invención se unen a receptores de glucagón con afinidad similar o mayor que el glucagón humano en tres especies diferentes (receptores de humano, de ratón y de rata).

Actividad funcional y selectividad

La actividad funcional y la selectividad se determinan cuantificando el AMPc intracelular en células HEK293 que expresan el receptor de glucagón humano (hGcg-R), el receptor de péptido similar al glucagón humano tipo 1 (hGLP-1R) o el péptido inhibidor gástrico humano (también conocido como glucosa dependiente del receptor de polipéptido insulínico, hGIP-R). Los protocolos y resultados experimentales se describen a continuación.

El ensayo de AMPc funcional hGcg-R usa células 293HEK que expresan hGcg-R clonado (Lok, S, et. al., Gene 140 (2), 203-209 (1994)). El ADNc de hGcg-R se subclona en el plásmido de expresión pHd (expresión transactivada de la proteína C humana recombinante completamente carboxilada gamma, un factor antitrombótico. Grinnell, BW, et al., Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y las células se seleccionan con $200 \mu\text{g/ml}$ de higromicina.

El ensayo de AMPc funcional hGLP-1-R utiliza células 293HEK que expresan hGLP-1-R clonado (Graziano MP, Hey PJ, Borkowski D, Chicchi GG, Strader CD, Biochem Biophys Res Commun. 196 (1): 141-6, 1993). El ADNc de hGLP-1R se subclona en el plásmido de expresión pHd (expresión transactivada de la proteína C humana recombinante completamente carboxilada gamma, un factor antitrombótico. Grinnell, BW, Berg, DT, Walls, J. y Yan, SB Bio/Technology 5: 1189-1192, 1987). Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y las células se seleccionan con 200 µg/ml de higromicina.

El ensayo funcional hGIP-R usa hGIP-R (Usdin, T.B., Gruber, C., Modi, W. Y Bonner, T.I., GenBank: AAA84418,1) clonado en el plásmido pcDNA3.1 (Promega)-NeoR. El plásmido hGIP-R-pcDNA3.1/Neo se transfecta en células de ovario de hámster chino, CHO-S, para cultivos en suspensión y se selecciona en presencia de 500 µg/ml de Geneticina (Invitrogen).

Cada línea celular que sobreexpresa el receptor se trata con péptido en DMEM (Medio Eagle Modificado por Dulbecco, Catálogo Gibco # 31053) suplementado con 1X GlutaMAX™ (dipéptido L-alanil-L-glutamina en NaCl al 0,85%, Catálogo Gibco # 35050), 0,1% de caseína (Catálogo Sigma # C4765), 250 µM IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) y 20 mM de HEPES [N-(2-Hidroxietil)piperazina-N'-(ácido 2-etanosulfónico), Catálogo HyClone # SH30237,01] en un volumen de ensayo de 40 µl. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, el aumento resultante en AMPc intracelular (adenosina 3', monofosfato 5'-cíclico) se determina cuantitativamente usando el kit de ensayo CisBio AMPc Dynamic 2 HTRF (CisBio 62AM4PEC). Los niveles de AMPc dentro de la célula se detectan agregando el conjugado AMPc-d2 en el tampón de lisis celular (20 µl) seguido por el anticuerpo anti-AMPc-Eu3*-Criptato, también en el tampón de lisis celular (20 µl). El ensayo competitivo resultante se incuba durante al menos 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de detección utilizando un instrumento PerkinElmer Envision® con excitación a 320 nm y emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades Envision (emisión a 665nm/620nm*10.000) son inversamente proporcionales a la cantidad de AMPc presente y se convierten en nM AMPc por pozo usando una curva estándar de AMPc. La cantidad de AMPc generada (nM) en cada pocillo se convierte en un porcentaje de la respuesta máxima observada con 10 nM de GLP-1(7-36)NH₂ humano (para el ensayo de hGLP-1R), 10 nM de Gcg humano (para el ensayo hGcg-R) o 10 nM GIP(1-42)NH₂ humano (para el ensayo hGIP-R). Un valor relativo de EC₅₀ y un porcentaje superior (E_{max}) se obtienen mediante análisis de regresión no lineal utilizando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido agregado, ajustada a una ecuación logística de cuatro parámetros.

Los datos funcionales para los Ejemplos 1-7, GIP(1-42)NH₂ humano, GLP-1(7-36)NH₂ humano y Gcg humano se muestran en la Tabla 2 a continuación. Las medias para EC₅₀ se expresan como medias geométricas ± error estándar de la media (SEM) con el número de repeticiones (n) indicado entre paréntesis. Un calificador (>) indica que el % de eficacia no alcanzó el 50% y la EC₅₀ calculada se obtiene utilizando la concentración más alta probada.

Tabla 2

	hGcg-R EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)	hGlp-1R EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)	hGIP-R EC ₅₀ , nM ± SEM, (n)
Ejemplo 1	0,00436 ± 0,00079 (n=4)	73,9 ± 19,6 (n=2)	>500 (n=3)
Ejemplo 2	0,0112 ± 0,0025 (n=3)	>100 (n=2)	>500 (n=3)
Ejemplo 3	0,00340 ± 0,00010 (n=2)	>100 (n=2)	>500 (n=3)
Ejemplo 4	0,00278 ± 0,00010 (n=2)	19,0 ± 8,2 (n=2)	>500 (n=3)
Ejemplo 5	0,0160 ± 0,0038 (n=2)	27,0 ± 4,5 (n=2)	>500 (n=3)
Ejemplo 6	0,00413 ± 0,00026 (n=2)	>100 (n=3)	>500 (n=3)
Ejemplo 7	0,0166 ± 0,0004 (n=2)	>100 (n=3)	>500 (n=3)
Glucagón Humano	0,00760 ± 0,00101 (n=7)	7,70 ± 1,03 (n=2)	>500 (n=3)
GLP-1 Humano	>10 (n=1)	0,076 ± 0,017 (n=2)	>500 (n=3)
GIP Humano	>10 (n=1)	>10 (n=1)	0,145 ± 0,041 (n=3)

Estos datos indican que los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención tienen una potencia similar en el receptor de glucagón como el glucagón humano con una selectividad incrementada con respecto al receptor GLP-1 y al receptor GIP.

Farmacocinética

Farmacocinética en ratas

A las ratas macho Sprague Dawley se les administra una dosis subcutánea única (100 nmoles/kg) de un compuesto de ejemplo en Tampón Tris (pH 8,0) a un volumen de 1 ml/kg. Se recoge sangre de cada animal a las 1, 6, 12, 24,

48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 240 horas después de la dosis.

Las concentraciones plasmáticas de los compuestos se determinan por procedimientos LC/MS. Cada procedimiento midió el péptido intacto (péptido más extensión ligada de tiempo). Para cada ensayo, el compuesto y un análogo, usado como un estándar interno (IS), se extraen del 100% de plasma de rata o mono (50 µl) usando metanol y ácido fórmico al 0,1%. Se forman dos capas distintas tras la centrifugación con el compuesto y el IS ubicado en el sobrenadante. Una parte alícuota de 275 µl del sobrenadante se transfiere a una placa de precipitación de proteína termo en la que se aplica un vacío para recoger el flujo a través de una placa de 96 pocillos.

Las muestras se secan con gas nitrógeno calentado para eliminar el sobrenadante. Se agrega un volumen de 150 µl de acetonitrilo al 30% y ácido fórmico al 5% a los pocillos para reconstituir las muestras. Las muestras inyectadas (20 µl) se cargan en una columna de 3 µm Supelco Analytical Discovery BIO Wide Pore C5-3, 5 cm X 0,1 mm. El efluente de la columna se dirige a un espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive para detección y cuantificación.

Los parámetros farmacocinéticos medios después de una dosis subcutánea única de 100 nmol/kg a ratas Sprague Dawley macho se proporcionan en la Tabla 3 a continuación (n = 3 para los Ejemplos 1, 2 y 5 y T_{max} y C_{max} para los Ejemplos 3 y 4; n = 2 para T_{1/2}, AUC_{0-inf} y CL/F para los Ejemplos 3 y 4).

Tabla 3

Compuesto	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C _{max} (nmol/l)	AUC _{0-inf} (hr*nmol/l)	CL/F (ml/hr/kg)
Ejemplo 1	13	8	425	11692	8,8
Ejemplo 2	22	24	346	21329	4,7
Ejemplo 3	11	8	394	11133	9,2
Ejemplo 4	16	6	257	5948	17,0
Ejemplo 5	22	24	237	12948	7,8

Abreviaturas: AUC_{0-inf} = área bajo la curva de 0 a infinito, CL/F = aclaramiento/biodisponibilidad, T_{max} = tiempo hasta la concentración máxima, C_{max} = concentración plasmática máxima, T_{1/2} = vida media, ND = sin datos.

Estos datos muestran que los Ejemplos 1-5 tienen una duración de acción prolongada con respecto al glucagón humano nativo, que tiene una T_{1/2} de aproximadamente 30 minutos.

Farmacocinética en monos Cynomolgus

A los monos Cynomolgus machos se les administra una sola dosis intravenosa (50 nmoles/kg) o subcutánea (50 nmoles/kg) de un compuesto de prueba en Tampón Tris (pH 8,0) a un volumen de 0,25 ml/kg. Se recoge sangre de cada animal a las 0,5 (solo IV), 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 168, 192, 240, 336, 480, 576 y 672 horas después de la dosis. Las concentraciones plasmáticas de los compuestos se determinan por procedimientos LC/MS, generalmente como se describió anteriormente en los estudios de ratas Sprague Dawley.

Los parámetros farmacocinéticos medios (n = 2) se proporcionan a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4

Compuesto (Vía/ dosis)	Animal ID	T _{1/2} (hr)	T _{max} (hr)	C ₀ o C _{max} (nmol/l)	AUC _{0-inf} (hr*nmol/l)	CL o CL/F (ml/hr/kg)
Ejemplo 1 (IV 50 nmol/kg)	Media	42	NA	1182	37278	1,36
Ejemplo 1 (SC 50 nmol/kg)	Media	44	9	425	31821	1,57
Ejemplo 2 (SC 50 nmol/k)	Media	79	18	377	46292	1,08

Abreviaturas: AUC_{0-inf} = área bajo la curva de 0 a infinito, CL = aclaramiento, CL/F = aclaramiento/biodisponibilidad, T_{max} = tiempo hasta la concentración máxima, C₀ = concentración extrapolada al tiempo 0 hora, C_{max} = concentración plasmática máxima, T_{1/2} = vida media, NA = no aplicable.

Estos datos muestran que los Ejemplos 1 y 2 tienen una duración de acción prolongada con respecto al glucagón

humano nativo, que tiene un $T_{1/2}$ de menos de una hora.

Estudios in vivo

5 Monitoreo continuo de glucosa en ratas

Las ratas Sprague-Dawley macho normales de 12-14 semanas de edad (HARLAN™, Indianápolis, IN) se alojan individualmente en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con ciclo de luz/oscuridad de 12 horas y libre acceso a los alimentos (TD2014 TEKLAD GLOBAL RODENT DIET®, HARLAN™ Labs, Indianapolis, IN) y agua. Después de 2 semanas de aclimatación a la instalación, las ratas se implantan con transmisores HD-XG (Data Sciences International, St Paul, MN).

La cirugía de implantación del transmisor se realiza bajo anestesia de isoflurano (2-cloro-2-(difluorometoxi)-1,1,1-trifluoroetano) del 2% al 3%. El sensor de glucosa del transmisor se coloca en la aorta descendente. El sensor de temperatura del transmisor se coloca en la cavidad abdominal con el cuerpo del transmisor. Siete días después de la cirugía de implantación del transmisor, todas las ratas se colocan en receptores de telemetría para registrar continuamente las mediciones de glucosa en sangre y temperatura corporal central a intervalos de 1 minuto mientras las ratas se mueven libremente en sus jaulas domésticas. La adquisición de datos es controlada y analizada por el software del sistema DATAQUEST A.R.T.™ (Data Sciences International, St Paul, MN). La calibración inicial del sensor de glucosa se logra a través de una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT) 7 días después de la cirugía y las calibraciones posteriores se realizan cada dos días a través de mediciones de glucosa a través de la sangre de la cola. A partir de los días 9-11 después de la cirugía, los compuestos de prueba a una dosis de 10 nmol/kg se administran una vez por inyección subcutánea en un tampón Tris-HCl 20 mM a pH 8,0, 1 ml/kg de peso corporal. Los niveles de glucosa en sangre se monitorean hasta por 7 días.

Los datos de glucosa en sangre indican que los Ejemplos 1 - 7 dan como resultado un aumento sostenido en los niveles de glucosa en sangre de una manera dependiente de la dosis.

30 Efectos sobre las concentraciones de glucosa en sangre en vacas lecheras

Cinco vacas lecheras Holstein no lactantes, con un promedio de 1313 libras (595 kg) y que han completado al menos una lactancia normal, se tratan con dosis crecientes del Ejemplo 6. Las vacas se tratan inicialmente con una inyección subcutánea de 1,5 mg/vaca del Ejemplo 6. Las concentraciones de glucosa en sangre se miden a diversos intervalos utilizando un glucómetro de mano hasta 168 horas después de la dosificación. Para este período de dosificación y todos los períodos de dosificación posteriores, las concentraciones de glucosa en sangre medidas en el tiempo cero sirven como la línea basal para ese período. Una semana después de la dosis inicial, las vacas se tratan con 5,0 mg/vaca SC del Ejemplo 6. Las concentraciones en sangre se monitorean nuevamente durante 168 horas después del tratamiento. Por último, dos semanas después de la dosis de 5,0 mg/vaca del Ejemplo 6, todas las vacas se tratan con 15 mg/vaca SC del Ejemplo 6 y las concentraciones de glucosa en sangre se monitorean hasta por 336 horas después de la dosificación.

Los datos se proporcionan en la Tabla 5. Todas las dosis probadas del Ejemplo 6 dan como resultado un aumento brusco de las concentraciones de glucosa en sangre por encima de las concentraciones basales. Además, la administración de 1,5, 5,0 y 15,0 mg/vaca produce aumentos sostenidos en la glucosa en sangre que duran hasta 96, 144 y 312 horas, respectivamente.

Tabla 5

Glucosa en sangre (mg/dl) en vacas lecheras no lactantes después de la inyección subcutánea del Ejemplo 6			
Horas	1,5 mg/vaca	5,0 mg/vaca	15,0 mg/vaca
Post-dosificación	(n=5)	(n=5)	(n=5)
0	61,0	57,6	59,2
2	70,2**	75,6**	88,4**
4	76,8**	76,2**	71,0*
8	74,8**	75,2**	65,2
24	66,6^	70,4**	68,2^
48	66,6^	75,6**	74,2**
72	72,6**	72,4**	78,0**
96	68,6**	68,6*	76,8**

5	120	64,4	67,0*	70,8*
	144	58,8	67,8*	72,0*
	168	57,6	63,6	73,6**
	192			77,4**
	216			79,2**
10	240			75,8**
	264			76,6**
	288			69,4
	312			71,4*
15	336			66,6
	SE	2,3	2,8	3,8
	^ P<,10, * P<,05, ** P<,01 vs tiempo 0 (línea basal)			

Características físicas y químicas

Solubilidad y Estabilidad

Las muestras de los Ejemplos 1-6 se preparan a 5 mg/ml en H₂O y se dializan como se describe en tampones C6N (citrato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6), C7N (citrato 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7), H6,5N (Histidina 10 mM, NaCl 100 mM, pH 6,5) y H7,5N (Histidina 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). Las muestras se concentran a 10 mg/ml de péptido como se describe y se mantienen a 4 °C durante una semana. Las muestras se evalúan visualmente y por SEC-HPLC como se describió anteriormente.

Los Ejemplos 1-6 en todas las formulaciones son transparentes e incoloros después de una semana a 4 °C. Los datos de SEC-HPLC se proporcionan en la Tabla 6. No se produce un crecimiento significativo en el polímero de alto peso molecular (HMW) o la pérdida del pico principal. La recuperación por SEC-HPLC está dentro del 5% para los Ejemplos 1-6.

Tabla 6

Tampón	Δ % Pico HMW				
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 6
C6N	0,13	-0,03	-0,01	0,64	-0,03
C7N	0	-0,06	0,16	0,26	-0,26
H6,5N	-0,02	0,06	-0,03	0,35	0,11
H7,5N	0,35	-0,15	-0,09	0,44	0,14
Tampón	Δ % Pico Principal				
	Ejemplo 1	Ejemplo 2	Ejemplo 3	Ejemplo 4	Ejemplo 6
C6N	-0,02	0,08	0,08	-3,42	-0,98
C7N	0,26	-0,26	-0,18	-1,19	0,36
H6,5N	-0,39	-1,28	-0,58	-2,88	-1,17
H7,5N	-1,43	-0,87	-1,21	-0,79	-1,68

La solubilidad de los Ejemplos 1-2 también se evalúa en tres formulaciones adicionales: T7 (Tris-HCl 10 mM, pH 7), T7Tm (Tris-HCl 10 mM, polisorbato-20 al 0,02%, m-cresol 29 mM, pH 7) y T7Nm (Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, m-cresol 29 mM, pH 7). Los compuestos se preparan en T7 mediante diálisis como se describió anteriormente. Las muestras se formulan a 2 mg/ml en T7, T7Tm o T7Nm y luego se concentran a 10 mg/ml de péptido como se describió anteriormente. Las formulaciones se mantienen durante una semana a 4 °C y se evalúan visualmente y por SEC-HPLC y RP-HPLC como se describió anteriormente.

Todas las formulaciones permanecen claras e incoloras. Los datos SEC-HPLC y RP-HPLC se encuentran en la Tabla 7. El crecimiento del polímero HMW no excede el 0,2% para ninguna formulación. La recuperación máxima por RP-HPLC está dentro del 5% para todas las formulaciones.

Tabla 7

Péptido	Formulación	% Δ HMW
Ejemplo 1	T7m	0,1
	T7Nm	0,05
	T7Tm	0,18
Ejemplo 2	T7m	0,1
	T7Nm	0,08
	T7Tm	0,07

Estos datos indican que los Ejemplos 1-6 tienen propiedades de solubilidad aceptables en diferentes condiciones de tampón.

Estabilidad química

La estabilidad química para el Ejemplo 1 se determina en diferentes tampones de varios valores de pH. Las muestras se preparan en H₂O a una concentración de 5 mg/ml, se dializan usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer, 2000 MWCO (número de parte 66203) durante la noche a 4 °C en el tampón de interés, se filtran a través de un filtro de 0,22 μm (Millex, SLGV013SL) luego diluido a 1 mg/ml en el tampón respectivo. Las composiciones tampón son Tris-HCl 10 mM en H₂O pH 8 (T8), Tris-HCl 10 mM en H₂O pH 7 (T7), Histidina 10 mM en H₂O pH 7 (H7), o Citrato 10 mM en H₂O pH 6 (C6). Cada muestra de 1 mg/ml se transfiere a tres viales. Las muestras se mantienen a 4 °C, 25 °C y 40 °C. Las muestras se evalúan cada dos semanas durante un total de cuatro semanas. Las muestras se evalúan visualmente para determinar la turbidez y la separación de fases. La estabilidad del compuesto se evalúa mediante HPLC analítica de fase inversa (RP-HPLC) en una columna Waters Symmetry Shield RP18, 3,5 μm, 4,6 X 100 mm (número de parte 18600179) calentada a 60 °C con un gradiente AB (A = 0,1% TFA/H₂O, B = 0,085% TFA/acetonitrilo) de 10% B isocrático durante 3 min, 30% B durante 3 min, 30-60% B durante 30 min, y 95% B durante 2 min a una velocidad de flujo de 0,9 ml/min (longitud de onda de 214 nm). La estabilidad también se evalúa mediante HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) en una columna Insulin HMWP, 7,8 X 300 mm (número de parte WAT2015549) con un tampón de fosfato de sodio 20 mM, acetonitrilo al 20%, pH 7,2 a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min durante 40 min.

El aspecto físico es claro a incoloro, sin opalescencia ni partículas a pH 7 y pH 8 para el Ejemplo 1. Los resultados de RP-HPLC y SEC-HPLC se resumen en la Tabla 8 a continuación. La recuperación está dentro del 5% por RP-HPLC y SEC-HPLC, lo cual es aceptable.

Tabla 8

Temp	%Δ pico principal por RP a las 4 semanas			
	T8	T7	H7	C6
4 °C	3,13%	2,52%	1,73%	2,01%
25 °C	4,84%	2,92%	0,12%	3,05%
40 °C	1,41%	1,74%	8,69%	3,61%
Temp	%Δ pico principal por SEC a las 4 semanas			
	T8	T7	H7	C6
4 °C	0,21%	0,6%	1,77%	0,31%
25 °C	0,17%	0,1%	3,1%	8,72%
40 °C	0,65%	0,97%	1,22%	1,17%

Las muestras en tampón T8 mantenidas a 4 °C y 40 °C durante cuatro semanas también se analizan por cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS). No se identifican sitios importantes de degradación para el Ejemplo 1 a pH 8. En general, la estabilidad química para el Ejemplo 1 indica una excelente estabilidad en las condiciones de tampón ensayadas.

Estabilidad Física

Las muestras de prueba del Ejemplo 1 se preparan mediante diálisis en tampón T7 y luego se formulan a 2 mg/ml de péptido en T7m, T7Nm y T7Tm como se describió anteriormente. Cada formulación se transfiere a viales de vidrio limpios y se agita a 400 rpm a través de un escape magnético recubierto de teflón a temperatura ambiente

durante 6 horas. Se toman alícuotas de 100 µl para evaluación a tiempo 0, 1 hora, 3 horas y 6 horas. Las muestras se evalúan visualmente y por SEC-HPLC como se indicó anteriormente.

Todas las formulaciones permanecen claras e incoloras sin opalescencia ni precipitación. Como se muestra en la Tabla 9, los porcentajes de péptidos en el pico principal de SEC-HPLC permanecen dentro del 5% para todas las formulaciones. Los datos indican que el Ejemplo 1 tiene buenas características de estabilidad física en las condiciones probadas.

Tabla 9

Formulación	% Pico Principal			
	Tiempo 0	1 Hora	3 Horas	6 Horas
T7m	95,94	96,02	96,18	95,69
T7Nm	95,39	95,45	95,43	95,43
T7Tm	96,21	96,12	96,27	96,18

Estudios de combinación

Actividad en la co-formulación con el co-agonista GIP-GLP-1 o el agonista GLP-1R

Las co-formulaciones de los Ejemplos 1 y 3 con un co-agonista GIP-GLP-1 de la SEQ ID NO: 15 o dulaglutida se preparan como se describe a continuación en los estudios de estabilidad, y se miden las actividades de compuestos individuales y co-formulaciones utilizando los procedimientos descritos anteriormente. Los datos se muestran en las Tablas 10 y 11. Un calificador (>) indica que el % de eficacia no alcanzó el 50% y que la EC₅₀ calculada se obtiene utilizando la concentración más alta probada.

Tabla 10

		EC ₅₀ (promedio de N = 2 ± desviación estándar, *N = 1)		
Tratamiento	Condiciones de Muestra	Ensayo de Receptor Gcg	Ensayo de Receptor GLP-1	Ensayo de Receptor GIP
Ejemplo 3	T7-4C-4wk	14,3 ± 3,4 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	24,9 ± 2,9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	21,1 ± 4,0 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	21,1 ± 5,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
Ejemplo 3 + co-agonista GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	21,3 ± 2,5 pM	1,47 nM*	0,65 nM*
	T7-40C-4wk	21,9 ± 0,4 pM	2,66 nM*	0,74 nM*
	T7m-4C-4wk	16,0 ± 3,4 pM	3,08 nM*	0,71 nM*
	T7m-40C-4wk	24,2 ± 0,5 pM	2,61 nM*	0,40 nM*
Ejemplo 1	T7-4C-4wk	20,3 ± 2,5 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	21,7 ± 3,4 pM	57,53 nM*	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	23,0 ± 0,3 pM	43,83 nM*	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	19,4 ± 5,0 pM	49,66 nM*	> 100 nM
Ejemplo 1 + co-agonista GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	23,7 ± 0,7 pM	1,78 nM*	0,49 ± 0,16 nM
	T7-40C-4wk	19,2 ± 2,4 pM	1,65 nM*	0,60 ± 0,21 nM
	T7m-4C-4wk	16,5 ± 1,8 pM	1,41 nM*	0,39 ± 0,06 nM
	T7m-40C-4wk	18,7 ± 0,6 pM	1,21 nM*	0,36 ± 0,34 nM
co-agonista GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	> 100 nM	2,56 nM*	0,70 nM*
	T7-40C-4wk	> 100 nM	2,76 nM*	0,41 nM*
	T7m-4C-4wk	> 100 nM	1,61 nM*	0,30 ± 0,19 nM

	T7m-40C-4wk	> 100 nM	0,73 nM*	0,15 ± 0,02 nM
--	-------------	----------	----------	----------------

Tabla 11

		EC ₅₀ (promedio de N = 2 ± desviación estándar)		
Péptido	Condiciones de Muestra	Ensayo de Receptor Gcg	Ensayo de Receptor GLP-1	Ensayo de Receptor GIP
Ejemplo 1	C6,5-4C-4wk	17,8 ± 6,8 pM	41,6 ± 5,0 nM	> 100 nM
	C6,5-40C-4wk	24,3 ± 11,1 pM	54,6 ± 46,2 nM	> 100 nM
	C6,5MT-4C-4wk	18,8 ± 1,8 pM	55,6 ± 9,2 nM	> 100 nM
	C6,5MT-40C-4wk	14,6 ± 5,0 pM	47,9 ± 5,8 nM	> 100 nM
Ejemplo 3	C6,5-4C-4wk	36,9 ± 29,6 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6,5-40C-4wk	25,7 ± 6,9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6,5MT-4C-4wk	19,3 ± 1,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
	C6,5MT-40C-4wk	21,4 ± 3,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
Ejemplo 1 + Dulaglutida	C6,5MT-4C-4wk	14,6 ± 0,8 pM	0,36 ± 0,01 nM	> 100 nM
	C6,5MT-40C-4wk	15,2 ± 6,4 pM	0,37 ± 0,00 nM	> 100 nM
Ejemplo 3 + Dulaglutida	C6,5MT-4C-4wk	22,7 ± 5,2 pM	0,57 ± 0,25 nM	> 100 nM
	C6,5MT-40C-4wk	22,6 ± 2,1 pM	0,30 ± 0,01 nM	> 100 nM
Dulaglutida	C6,5-4C-4wk	51,9 ± 68,1 nM	0,37 ± 0,11 nM	> 100 nM
	C6,5-40C-4wk	> 100 nM	0,31 ± 0,17 nM	> 100 nM
	C6,5MT-4C-4wk	54,0 ± 65,0 nM	0,40 ± 0,14 nM	> 100 nM
	C6,5MT-40C-4wk	> 100 nM	0,29 60,09 nM	> 100 nM

Estos datos indican que la bioactividad de los Ejemplos 1 y 3 se mantiene bajo condiciones estresadas y no estresadas y/o en combinación con un agonista GLP-1R o co-agonista GIP-GLP-1.

Estudios *in vivo* de combinaciones con agonistas GLP-1R o co-agonistas GIP-GLP-1

Los efectos de combinaciones de agonistas del receptor de glucagón de la presente invención con agonistas GLP-1R de acción prolongada o co-agonistas GIP-GLP-1 se prueban en ratones obesos inducidos por la dieta (DIO) C57/BL6. El co-agonista GIP-GLP-1 tiene la estructura de la SEQ ID NO: 14, como se describió anteriormente. El agonista GLP-1R es una fusión GLP-1-Fc descrita en el documento WO2005000892. Las co-formulaciones se preparan generalmente como se describe a continuación en los estudios de estabilidad de la co-formulación.

Los animales DIO C57/BL6, aunque no son diabéticos, muestran resistencia a la insulina, dislipidemia y esteatosis hepática, todas características del síndrome metabólico, después de recibir una dieta alta en grasas (60% Kcal de grasa) durante 12 semanas. Por lo tanto, los estudios en estos animales pueden usarse para investigar los efectos de la(s) terapéutica(s) propuesta(s) en parámetros tales como pérdida de peso, composición corporal y esteatosis hepática.

Se usan ratones DIO C57/B16 machos de 20-21 semanas de edad que pesan 42-47 g y que tienen una masa grasa inicial que varía de 11,9 g a 17,2 g. Los animales se alojan individualmente en una instalación de temperatura controlada (24 °C) con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas (luces encendidas a las 22:00), y tienen acceso libre a alimentos y agua. Después de 2 semanas de aclimatación a la instalación, los ratones se asignan al azar a grupos de tratamiento (n = 5/grupo) según el peso corporal, por lo que cada grupo tiene un peso corporal medio inicial similar.

Vehículo, compuestos de prueba (intervalo de dosis de 3 a 10 nmol/kg), agonista GLP-1R (10 nmol/kg), co-agonista GIP-GLP-1 (10 nmol/kg) o combinaciones de los mismos (intervalo de dosis 3 a 10 nmol/kg) disueltos en el vehículo (tampón Tris-HCl 20 mM, pH 8,0) se administran mediante inyección SC a ratones alimentados a voluntad 30-90 minutos antes del inicio del ciclo oscuro cada tres días durante 15 días. Las inyecciones SC se realizan los días 1, 4, 7, 10 y 13. El peso corporal diario, la ingesta de alimentos y la glucosa se miden durante todo el estudio. Los cambios absolutos en el peso corporal se calculan restando el peso corporal del mismo animal antes de la primera inyección de molécula. En los días 0 y 14, la masa grasa total se mide por resonancia magnética nuclear (RMN)

usando un instrumento Echo Medical System (Houston, TX).

La glucosa en sangre diaria se mide con glucómetro Accu-Chek (Roche) de la sangre de la vena de la cola. Al final del estudio, los animales se sacrifican y los hígados se extraen y congelan. Los triglicéridos hepáticos, determinados a partir de homogeneizados de hígados recogidos durante el sacrificio, y el colesterol en plasma se miden en un analizador clínico Hitachi Modular P. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizan mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los valores de ED₅₀ para bajar de peso se determinan en GraphPad Prism utilizando la herramienta de ajuste no lineal.

Los datos de pérdida de peso y porcentaje de cambio de masa grasa para los estudios realizados como se describió anteriormente se proporcionan a continuación en las Tablas 12 (Ejemplo 1) y 13 (Ejemplos 1 y 2). Los resultados en la Tabla 11 se expresan como Media ± SEM de 5 ratones por grupo. Los resultados en la Tabla 12 se expresan como Media ± SEM de 6 ratones por grupo.

Las combinaciones de los Ejemplos 1 y 2 con agonista GLP-1R o co-agonista GIP-GLP-1 tienen efectos sinérgicos sobre el peso corporal y la masa grasa en comparación con los efectos de los Ejemplos 1 o 2, agonista GLP-1R o co-agonista GIP-GLP-1 solo (Tablas 12 y 13).

Tabla 12

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	% de cambio desde el peso corporal inicial	% de cambio desde la masa de grasa inicial
Vehículo	0	-3,72 ± 1,169	-4,39 ± 1,84
Ejemplo 1	3	-6,07 ± 1,81	-9,60 ± 3,35
Ejemplo 1	10	-10,56 ± 1,78	-18,12 ± 3,40*
Agonista GLP1-R	10	-15,54 ± 1,67**	-28,32 ± 2,94***
Agonista GLP1-R + Ejemplo 1	10+3	-26,57 ± 2,05****	-49,88 ± 3,87****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 1	10+10	-30,78 ± 1,97****	-62,22 ± 4,10****
co-agonista GIP-GLP-1	10	-23,67 ± 1,83****	-48,21 ± 4,67****
co-agonista GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10+3	-34,83 ± 3,60****	-68,99 ± 4,05****
co-agonista GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10+10	-43,06 ± 2,49****	-82,06 ± 1,41****
*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 significativo del grupo de control con vehículo (One-Way ANOVA, Dunnett's),			

Tabla 13

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	% de cambio desde el peso corporal inicial	% de cambio desde la masa de grasa inicial
Vehículo	0	1,14 ± 1,02	3,17 ± 1,61
Agonista GLP1-R	10	-10,74 ± 1,42*	-21,52 ± 3,51*
co-agonista GIP-GLP-1	10	-17,76 ± 4,52***	-33,30 ± 7,35****
Ejemplo 1	3	-1,77 ± 2,08	-2,08 ± 3,59
Ejemplo 1	10	-3,87 ± 1,41	-6,20 ± 2,90
Ejemplo 2	3	-0,85 ± 2,71	0,11 ± 5,11
Ejemplo 2	10	-5,29 ± 0,84	-6,03 ± 1,99
Agonista GLP1-R+Ejemplo 1	10+3	-17,49 ± 2,90***	-34,41 ± 7,38****
Agonista GLP1-R+Ejemplo 1	10+10	-23,49 ± 1,40****	-48,16 ± 4,14****
Agonista GLP1-R+Ejemplo 2	10+3	-14,83 ± 2,43**	-27,21 ± 6,34**
Agonista GLP1-R+Ejemplo 2	10+10	-30,60 ± 4,33****	-55,55 ± 7,93****
Agonista GIP-GLP + Ejemplo 1	10+3	-18,41 ± 1,23****	-39,06 ± 4,13****
Agonista GIP-GLP + Ejemplo 1	10+10	-32,01 ± 3,81****	-65,66 ± 5,92****
Agonista GIP-GLP + Ejemplo 2	10+3	-15,94 ± 1,20***	-33,54 ± 3,43****
Agonista GIP-GLP + Ejemplo 2	10+10	-40,37 ± 4,03****	-76,34 ± 3,11****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 y ****p<0,0001 significativo del grupo de control con vehículo (One-Way ANOVA, Dunnett's),

Los datos acerca de los efectos sobre la glucosa en sangre, el colesterol en plasma y los triglicéridos hepáticos se proporcionan a continuación en las tablas 14 (media $\pm$ SEM, n = 5) y 15 (media $\pm$ SEM, n = 6). Mientras que los ejemplos 1 y 2 administrados individualmente aumentan la glucosa en sangre de una manera dependiente de la dosis, las combinaciones de tales agonistas del receptor de glucagón con agonistas de GLP-1R o co-agonistas de GIP-GLP-1 reducen la glucosa en sangre, el colesterol en plasma y los triglicéridos hepáticos.

Tabla 14

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	AUC de glucosa en sangre (mg/dl/15 días)	Colesterol en Plasma (mg/dl)	Triglicéridos Hepáticos (mg/g tejido)
Vehículo	0	2224 $\pm$ 78,55	228,00 $\pm$ 6,50	200,29 $\pm$ 33,67
Ejemplo 1	3	2553 $\pm$ 112,5*	207,00 $\pm$ 6,43	68,83 $\pm$ 65,82****
Ejemplo 1	10	2607 $\pm$ 109,4**	157,80 $\pm$ 15,44****	32,94 $\pm$ 11,23****
Agonista GLP1-R	10	1565 $\pm$ 26,39****	153,40 $\pm$ 11,64****	55,01 $\pm$ 12,62****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 1	10+3	1452 $\pm$ 25,48****	96,20 $\pm$ 7,86****	20,89 $\pm$ 4,39****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 1	10+10	1388 $\pm$ 80,92****	86,60 $\pm$ 3,47****	12,78 $\pm$ 1,57****
Co-agonista GIP-GLP-1	10	1453 $\pm$ 627,96****	137,80 $\pm$ 9,05****	32,60 $\pm$ 6,70****
Co-agonista GIP-GLP-1+ Ejemplo 1	10+3	1256 $\pm$ 111,5****	103,00 $\pm$ 3,56****	35,47 $\pm$ 15,78****
Co-agonista GIP-GLP-1+ Ejemplo 1	10+ 10	1044 $\pm$ 63,37****	77,40 $\pm$ 10,10****	24,99 $\pm$ 13,43****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 del grupo de control (One-Way ANOVA, Dunnett's),

Tabla 15

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	AUC de glucosa en sangre (mg/dl/15 días)	Colesterol en Plasma (mg/dl)	Triglicéridos Hepáticos (mg/g tejido)
Vehículo	0	1806 $\pm$ 52,85	224,40 $\pm$ 5,12	174,72 $\pm$ 26,56
Agonista GLP1-R	10	1189 $\pm$ 28,83***	149,50 $\pm$ 12,02****	46,06 $\pm$ 12,31****
Co-agonista GIP-GLP-1	10	1137 $\pm$ 63,27****	135,50 $\pm$ 7,11****	48,50 $\pm$ 7,18****
Ejemplo 1	3	2080 $\pm$ 103,2	230,50 $\pm$ 6,61	111,87 $\pm$ 22,43**
Ejemplo 1	10	2491 $\pm$ 110,9****	152,83 $\pm$ 8,82****	29,42 $\pm$ 3,54****
Ejemplo 2	3	2433 $\pm$ 124,7***	201,83 $\pm$ 10,11	75,45 $\pm$ 12,82****
Ejemplo 2	10	2641 $\pm$ 186,6****	117,67 $\pm$ 4,46****	16,33 $\pm$ 1,53****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 1	10+3	1081 $\pm$ 56,68****	132,50 $\pm$ 19,56****	34,34 $\pm$ 6,48****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 1	10+ 10	1031 $\pm$ 61,29****	83,33 $\pm$ 8,50****	25,57 $\pm$ 7,27****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 2	10+3	1098 $\pm$ 52,69****	152,00 $\pm$ 9,32****	38,99 $\pm$ 5,96****
Agonista GLP1-R + Ejemplo 2	10 + 10	1008 $\pm$ 107,2****	78,50 $\pm$ 6,03****	34,42 $\pm$ 14,36****
Co-agonista GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10+3	1142 $\pm$ 31,32****	131,83 $\pm$ 6,42****	22,48 $\pm$ 3,92****
Co-agonista GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10+ 10	916,9 $\pm$ 97,73****	91,67 $\pm$ 4,75****	6,99 $\pm$ 129****
Co-agonista GIP-GLP-1 + Ejemplo 2	10+3	1063 $\pm$ 20,89****	119,33 $\pm$ 5,79****	22,87 $\pm$ 5,94****
Co-agonista GIP-GLP-1 + Ejemplo 2	10+ 10	801,8 $\pm$ 48,21****	90,33 $\pm$ 7,89****	17,99 $\pm$ 9,65****

*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 del grupo de control (One-Way ANOVA, Dunnett's),

Estabilidad en Co-Formulación con co-agonista GIP-GLP-1

Las muestras de los Ejemplos 1 y 3 se preparan y dializan contra T7 como se describió anteriormente. Ambos ejemplos se formulan por separado a 1 mg/ml de péptido en T7, T7m, T7N y T7Nm. Un co-agonista GIP-GLP-1 de la SEQ ID NO: 15 también se prepara y dializa contra T7 como se describe para los agonistas del receptor de glucagón de ejemplo. El co-agonista GIP-GLP-1 está formulado a 1 mg/ml de péptido en T7, T7m y T7Nm. Las muestras formuladas conjuntamente que contienen 1 mg/ml del Ejemplo 1 y 1 mg/ml de co-agonista GIP-GLP-1 o 1 mg/ml del Ejemplo 3 y 1 mg/ml de co-agonista GIP-GLP-1 también se preparan y formulan en T7, T7m, T7N y T7Nm. Cada muestra formulada se transfiere a tres viales. Las muestras se mantienen a 4 °C, 25 °C y 40 °C. Las muestras se evalúan cada dos semanas durante un total de cuatro semanas. Las muestras se evalúan visualmente para determinar la turbidez y la separación de fases. La estabilidad se evalúa mediante RP-HPLC como se describió anteriormente para la formulación de agente único. El procedimiento RP-HPLC descrito proporciona una buena separación del compuesto del ejemplo y los picos principales del co-agonista GIP-GLP-1, así como todos los picos de degradación producidos al estresar la muestra a pH 9 y 40 °C durante 3 días.

La recuperación del pico total para todas las muestras está dentro del 5% por RP-HPLC. Todas las formulaciones permanecen claras e incoloras sin opalescencia ni precipitación. Los cambios en el porcentaje de péptidos en sus respectivos picos principales observados por RP-HPLC después de 4 semanas se resumen en la Tabla 16. La pérdida en porcentaje del pico principal no cambia significativamente para el Ejemplo 1 cuando se formula como un agente único en comparación con formulaciones con co-agonista GIP-GLP-1 en todas las formulaciones probadas. El co-agonista GIP-GLP-1 exhibe una pérdida constante en el porcentaje del pico principal cuando se formula como un agente único frente a co-formulaciones con el Ejemplo 1 o el Ejemplo 3. Los datos indican que los Ejemplos 1 y 3 tienen una estabilidad aceptable cuando se formulan como un agente único o formulado conjuntamente con un co-agonista GIP-GLP-1, y que los Ejemplos 1 y 3 no afectan negativamente a la estabilidad del co-agonista GIP-GLP-1 en la co-formulación.

Tabla 16

Compuesto(s)	Formulación	Cambio en el % del Pico Principal del Análogo de Glucagón			Cambio en el % del Pico Principal del Co-agonista GIP-GLP-1		
		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
Ejemplo 1	T7	-1,23	-2,91	-4,69	N/A		
	T7m	-0,6	-0,15	-2,36			
	T7N	-0,29	-1,39	-4,19			
	T7Nm	-0,38	-1,71	-3,93			
Ejemplo 1 + co-agonista GIP-GLP-1	T7	-1,57	-0,26	-3,59	-0,37	-0,37	-3,35
	T7m	-1,19	-0,92	-2,67	0,54	0,35	-3,76
	T7N	-0,25	-0,89	-2,15	-0,21	-0,57	-4,42
	T7Nm	-1,22	-1,94	-3,78	-0,71	-1,07	-5,50
Ejemplo 3	T7	-2,23	-7,00	-1,78	N/A		
	T7m	0,92	1,23	-0,78			
	T7N	-1,78	-6,13	-2,15			
	T7Nm	0,11	-0,76	-2,02			
Ejemplo 3 + co-agonista GIP-GLP-1	T7	-0,07	-7,51	-0,80	-0,40	-0,40	-4,14
	T7m	-3,17	-4,12	-5,08	-1,23	-1,23	-5,40
	T7N	-3,26	-7,50	-6,37	-0,22	-1,90	-6,12
	T7Nm	-2,75	-3,24	-3,35	-0,92	-0,87	-4,73
Co-agonista GIP-GLP-1	T7	N/A			-0,59	-2,12	-5,25
	T7m				0,10	-0,50	-4,3

	T7Nm	-0,85	-1,14	-4,66
--	------	-------	-------	-------

Las muestras del Ejemplo 1, el co-agonista GIP-GLP-1 y sus combinaciones formuladas en T7Nm, y las combinaciones del Ejemplo 1 y el co-agonista GIP-GLP-1 formuladas en T7, que se incuban a 4 °C y 40 °C durante cuatro semanas también se evalúan por LC-MS. No se identifican sitios importantes de degradación. Tanto para el Ejemplo 1 como para el co-agonista GIP-GLP-1, las modificaciones químicas no son significativamente diferentes para las formulaciones de agente único frente a las co-formulaciones.

Estabilidad en la co-formulación con agonista GLP-1R

Los Ejemplos 1 y 3 se preparan y dializan contra C6,5 (citrato 10 mM pH 6,5) usando el mismo procedimiento que el descrito anteriormente para la preparación en tampón T7. Los compuestos se formulan por separado a 1 mg/ml de péptido en tampón C6,5, C6,5M (citato 10 mM, 46,4 mg/ml de D-manitol, pH 6,5), C6,5T (citato 10 mM, polisorbato-80 al 0,02%, pH 6,5) y C6,5MT (citato 10 mM, 46,4 mg/ml de D-manitol, 0,02% de polisorbato-80, pH 6,5). Se utiliza una concentración de reserva de 46,5 mg/ml de dulaglutida en C6,5 para formular dulaglutida a 3 mg/ml en C6,5 y C6,5MT. Las co-formulaciones en C6,5MT se preparan con 3 mg/ml de dulaglutida y 1 mg/ml del Ejemplo 1, o 3 mg/ml de dulaglutida y 1 mg/ml del Ejemplo 3. Cada muestra formulada se transfiere a tres viales y se mantiene a 4 °C, 25 °C y 40 °C. Las muestras se evalúan cada dos semanas durante un total de cuatro semanas. Las muestras se evalúan visualmente para determinar la turbidez y la separación de fases. La estabilidad se evalúa mediante RP-HPLC y SEC-HPLC como se describió anteriormente. Ambos procedimientos de HPLC descritos dan una buena separación de los compuestos del Ejemplo y los picos principales de dulaglutida, así como todos los picos de degradación producidos al estresar la muestra a pH 9 y 40 °C durante 3 días.

La recuperación del pico total para todas las muestras de estabilidad está dentro del 5% tanto por RP-HPLC como por SEC-HPLC. Todas las formulaciones permanecen claras e incoloras sin opalescencia ni precipitación. Los cambios en el porcentaje de compuestos en sus respectivos picos principales observados por SEC-HPLC después de cuatro semanas se resumen en la Tabla 17. Los Ejemplos 1 y 3 son generalmente estables y no muestran una pérdida significativa del pico principal. El Ejemplo 1 no exhibe menos estabilidad cuando se formula conjuntamente con dulaglutida en comparación con las formulaciones de agente único. El Ejemplo 3 muestra un poco menos de estabilidad en la co-formulación con dulaglutida en comparación con las formulaciones de agente único. El agonista GLP-1R no exhibe menos estabilidad cuando se formula junto con el Ejemplo 1 o 3 en comparación con las formulaciones de agente único.

Tabla 17

Compuesto(s)	Formulación	Análogo de Glucagón Δ % Pico Principal			GLP-1-Fc Δ % Pico Principal		
		4 °C	25 °C	40 °C	4°C	25°C	40 °C
Ejemplo 1	C6,5	-1,32	-1,99	-2,35	N/A		
	C6,5M	0,70	-1,26	-1,67			
	C6,5T	-2,76	-3,97	-1,72			
	C6,5MT	-1,04	-2,65	-1,40			
Ejemplo 3	C6,5	1,03	-0,34	-0,37	N/A		
	C6,5M	0,49	-0,24	1,08			
	C6,5T	0,46	0,10	-0,02			
	C6,5MT	1,02	-0,07	0,64			
Dulaglutida	C6,5	N/A			0,19	-0,54	>-10
	C6,5MT				0,29	-0,87	-0,83
Ejemplo 1 + dulaglutida	C6,5MT	-0,67	-0,75	-0,75	0,25	-0,16	-0,16
Ejemplo 3 + dulaglutida	C6,5MT	-1,04	-1,90	-1,90	0,21	-0,11	-0,11

Como se observó por RP-HPLC, las tendencias de estabilidad son similares a las observadas por SEC-HPLC. Los cambios en el porcentaje de compuestos en sus respectivos picos principales observados por RP-HPLC después de cuatro semanas se resumen en la Tabla 18. Los Ejemplos 1 y 3 son generalmente estables y no muestran una pérdida significativa del pico principal. El Ejemplo 1 no exhibe menos estabilidad cuando se formula conjuntamente con el agonista GLP-1R en comparación con las formulaciones de agente único. El Ejemplo 3 muestra un poco

menos de estabilidad en la co-formulación con agonista GLP-1R en comparación con las formulaciones de agente único. El agonista GLP-1R no exhibe menos estabilidad cuando se formula conjuntamente con cualquiera de los ejemplos en comparación con las formulaciones de agente único.

Tabla 18

Compuesto(s)	Formulación	Análogo de Glucagón Δ % Pico Principal			GLP-1-Fc Δ % Pico Principal		
		4 °C	25 °C	40 °C	4°C	25 °C	40 °C
Ejemplo 1	C6,5	-0,06	-0,47	-3,73	N/A		
	C6,5M	0,34	-2,61	-4,47			
	C6,5T	0,51	-0,35	-3,57			
	C6,5MT	-0,98	-0,69	-4,39			
Ejemplo 3	C6,5	1,06	0,17	0,24	N/A		
	C6,5M	2,43	0,64	1,86			
	C6,5T	-2,11	*	-3,18			
	C6,5MT	-1,22	*	-0,4			
Agonista GLP-1R	C6,5	N/A			-1,45	>-10	-9,96
	C6,5MT				-0,46	-0,8	-7,47
Ejemplo 1 + Agonista GLP-1R	C6,5MT	0,62	*	-2,55	1,90	*	-8,18
Ejemplo 3 + Agonista GLP-1R	C6,5MT	-0,82	-2,49	-1,39	0,27	-3,05	-9,64
* Datos no disponibles debido a error del instrumento							

Secuencias**SEQ ID NO: 1 - Glucagón humano**

HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO: 2 - GLP-1 humano

HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

SEQ ID NO: 3 - OXM humana

HSQGTFTSDYSKYLSRRRAQDFVQWLMNTKRNRNIA

SEQ ID NO: 4 - GIP humano

YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO: 5 - Agonista del receptor de glucagónYX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que

X₁ es Aib;X₂ es T o L;X₃ es Aib;X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;X₅ es E o A;X₆ es T o E;X₇ está ausente o es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado.

SEQ ID NO: 6 - Agonista del receptor de glucagónYX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que

X₁ es Aib;X₂ es T;X₃ es Aib;X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 16;X₅ es E;

X₆ es T;
X₇ es GPSSGAPPPS;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

5 **SEQ ID NO: 7 - Agonista del receptor de glucagón**

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que:

X₁ es Aib;

X₂ es T;

10 X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 18;

X₅ es E;

X₆ es T;

15 X₇ es GPSSGAPPPS;

y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 8 - Agonista del receptor de glucagón

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

20 en la que:

X₁ es Aib;

X₂ es L;

X₃ es Aib;

25 X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 16;

X₅ es E;

X₆ es T; y

X₇ es GPSSGAPPPS;

y en la que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

30 **SEQ ID NO: 9 - Agonista del receptor de glucagón**

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que X₁ es Aib;

X₂ es T;

35 X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 16;

X₅ es E;

X₆ es T; y

40 X₇ es GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 10 - Agonista del receptor de glucagón

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

45 en la que X₁ es Aib;

X₂ es T;

X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 18;

50 X₅ es E;

X₆ es T; y

X₇ es GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

55 **SEQ ID NO: 11 - Agonista del receptor de glucagón**

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es T;

60 X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 1 y b es 16;

X₅ es A;

X₆ es E;

65 X₇ está ausente; y

el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal.

SEQ ID NO: 12 - Agonista del receptor de glucagón

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es T;

X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 1 y b es 18;

X₅ es A;

X₆ es E;

X₇ está ausente; y

el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal.

SEQ ID NO: 13 - Co-agonista GIP-GLP

YX₁EGTFIFSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS;

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es Aib;

X₃ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_aCO(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 1 o 2 y b es 10 a 20;

X₄ es Phe o 1-naftilalanina (1-Nal);

y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado.

SEQ ID NO: 14 - Co-agonista GIP-GLP

YX₁EGTFTSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS;

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es Aib;

X₃ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 2 y b es 18;

X₄ es 1-Nal;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 15 - Co-agonista GIP-GLP

YX₁EGTFIFSDYSIX₂LDKIAQX₃AX₄VQWLIAGGPSSGAPPPS;

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es Aib;

X₃ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO(CH₂)_b-CO₂H en la que a es 1 y b es 18;

X₄ es Phe;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 16 - Agonista del receptor de glucagón

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es T o L;

X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, en la que a es 2 y b es 14 a 24;

X₅ es E;

X₆ es T;

X₇ es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está amidado.

SEQ ID NO: 17 - Agonista del receptor de glucagón

YX₁QGTFX₂SDYSKYLDX₃KKAX₄EFVX₅WLLEX₆X₇

en la que

X₁ es Aib;

X₂ es T;

X₃ es Aib;

X₄ es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K

con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)₂-(γGlu)_a-CO-(CH₂)_b-CO₂H, en la que a es 1 y b es 14 a 24;
X₅ es A;
X₆ es E; y
X₇ está ausente.

5

Listado de secuencias

<110> ELI LILLY AND COMPANY

10

<120> AGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN

<130> X21309

<150> 62/246,199

15

<151> 2015-10-26

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 1

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

30

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

35

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

<213> Homo sapiens

40

<400> 2

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

45

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

50

<210> 3

<211> 37

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

55

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

60

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

65

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 4
 <211> 42
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

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

15 Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
 35 40

<210> 5
 20 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 25 <223> constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 30 <223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (7) .. (7)
 35 <223> Xaa en la pos. 7 es Thr o Leu

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (16)
 40 <223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20) .. (20)
 45 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H, en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24

<220>
 50 <221> MISC_FEATURE
 <222> (24) .. (24)
 <223> Xaa en la pos. 24 es Glu o Ala.

<220>
 55 <221> MISC_FEATURE
 <222> (29) .. (29)
 <223> Xaa en la pos. 29 es Thr o Glu.

<220>
 60 <221> MISC_FEATURE
 <222> (30) .. (30)
 <223> Xaa en la pos. 30 es ya sea: ausente, o un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG, y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado

65 <400> 5

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Xaa Trp Leu Leu Glu Xaa Xaa
 20 25 30

<210> 6
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (16)
 <223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 2 y b es 16.

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39) .. (39)
 <223> Ser en la pos. 39 está amidada como una amida primaria C-terminal

<400> 6

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

Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
 20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

<210> 7
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MISC_FEATURE

<222> (16) .. (16)
 <223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 2 y b es 18

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39) .. (39)
 <223> Ser en la pos. 39 está amidada como una amida primaria C-terminal

15 <400> 7

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

20

	Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Glu	Thr	Gly	Pro	Ser
				20					25					30		

25

	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser
			35				

30 <210> 8
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 40 <223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (16)
 45 <223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (20) .. (20)
 50 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 2 y b es 16

<220>
 55 <221> MOD_RES
 <222> (39) .. (39)
 <223> Ser en la pos. 39 está amidada como una amida primaria C-terminal

<400> 8

60

65

ES 2 747 908 T3

	Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Leu Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
	1 5 10 15
5	Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
	20 25 30
10	Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
	35
	<210> 9
	<211> 34
	<212> PRT
15	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> constructo sintético
	<220>
20	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2) .. (2)
	<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico
	<220>
25	<221> MISC_FEATURE
	<222> (16) .. (16)
	<223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico
	<220>
30	<221> MISC_FEATURE
	<222> (20) .. (20)
	<223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 2 y b es 16
35	<220>
	<221> MOD_RES
	<222> (34) .. (34)
	<223> Gly en la pos. 34 está amidada como una amida primaria C-terminal
40	<400> 9
	Tyr Xaa Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Xaa
45	1 5 10 15
	Lys Lys Ala Xaa Glu Phe Val Glu Trp Leu Leu Glu Thr Gly Pro Ser
	20 25 30
50	Ser Gly
	<210> 10
55	<211> 34
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
60	<223> constructo sintético
	<220>
	<221> MISC_FEATURE
	<222> (2) .. (2)
65	<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (16)
 <223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 2 y b es 18

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34) .. (34)
 <223> Gly en la pos. 34 está amidada como una amida primaria C-terminal

15

<400> 10

20

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

25

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Glu	Trp	Leu	Leu	Glu	Thr	Gly	Pro	Ser
			20					25					30		

30

Ser	Gly														
-----	-----	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

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

35

<220>
 <223> constructo sintético

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (16) .. (16)
 <223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 1 y b es 16

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (29) .. (29)
 <223> Glu en la pos. 29 es ácido C-terminal

60

<400> 11

65

ES 2 747 908 T3

		Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Xaa
		1				5					10					15	
5		Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Leu	Glu	Glu			
					20					25							
		<210> 12															
		<211> 29															
10		<212> PRT															
		<213> Secuencia artificial															
		<220>															
		<223> constructo sintético															
15		<220>															
		<221> MISC_FEATURE															
		<222> (2) .. (2)															
		<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico															
20		<220>															
		<221> MISC_FEATURE															
		<222> (16) .. (16)															
		<223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico															
25		<220>															
		<221> MISC_FEATURE															
		<222> (20) .. (20)															
30		<223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en la que a es 1 y b es 18															
		<220>															
		<221> MOD_RES															
35		<222> (29) .. (29)															
		<223> Glu en la pos. 29 es ácido C-terminal.															
		<400> 12															
40		Tyr	Xaa	Gln	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Lys	Tyr	Leu	Asp	Xaa
		1				5					10					15	
45		Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Ala	Trp	Leu	Leu	Glu	Glu			
					20					25							
		<210> 13															
		<211> 39															
		<212> PRT															
50		<213> Secuencia artificial															
		<220>															
		<223> constructo sintético															
55		<220>															
		<221> MISC_FEATURE															
		<222> (2) .. (2)															
		<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico															
60		<220>															
		<221> MISC_FEATURE															
		<222> (13) .. (13)															
		<223> Xaa en la pos. 13 es ácido alfa Aminoisobutírico															
65		<220>															

<221> MISC_FEATURE
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO(CH2)b-CO2H en la que a es 1 o 2 y b es 10 a 20

5

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22) .. (22)
 <223> Xaa en la pos. 22 es Phe o 1-naftilalanina (1-Nal)

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39) .. (39)
 <223> Ser en la pos. 39 está opcionalmente amidada

15

<400> 13

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

20

Ile Ala Gln Xaa Ala Xaa Val Gln Trp Leu Ile Ala Gly Gly Pro Ser
 20 25 30

25

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
 35

30

<210> 14
 <211> 39
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> constructo sintético

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2) .. (2)
 <223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

40

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (13) .. (13)
 <223> Xaa en la pos. 13 es ácido alfa Aminoisobutírico

45

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20) .. (20)
 <223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO(CH2)b-CO2H en la que a es 2 y b es 18

50

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (22) .. (22)
 <223> Xaa en la pos. 22 es 1-Nal

55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (39) .. (39)
 <223> Ser en la pos. 39 está amidada como una amida primaria C-terminal

60

<400> 14

65

	Tyr	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Xaa	Leu	Asp	Lys
	1				5					10					15	
5	Ile	Ala	Gln	Xaa	Ala	Xaa	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
			20						25					30		
10	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser									
			35													
	<210> 15															
	<211> 39															
	<212> PRT															
15	<213> Secuencia artificial															
	<220>															
	<223> constructo sintético															
20	<220>															
	<221> MISC_FEATURE															
	<222> (2) .. (2)															
	<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico															
25	<220>															
	<221> MISC_FEATURE															
	<222> (13) .. (13)															
	<223> Xaa en la pos. 13 es ácido alfa Aminoisobutírico															
30	<220>															
	<221> MISC_FEATURE															
	<222> (20) .. (20)															
	<223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO(CH2)b-CO2H en la que a es 1 y b es 18															
35	<220>															
	<221> MOD_RES															
	<222> (39) .. (39)															
40	<223> Ser en la pos. 29 está amidada como una amida primaria C-terminal															
	<400> 15															
45	Tyr	Xaa	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Tyr	Ser	Ile	Xaa	Leu	Asp	Lys
	1				5					10					15	
50	Ile	Ala	Gln	Xaa	Ala	Phe	Val	Gln	Trp	Leu	Ile	Ala	Gly	Gly	Pro	Ser
			20						25					30		
55	Ser	Gly	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser									
			35													
	<210> 16															
	<211> 30															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
60	<220>															
	<223> constructo sintético															
	<220>															
	<221> MISC_FEATURE															
65	<222> (2) .. (2)															

<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (7) .. (7)
<223> Xaa en la pos. 7 es Thr o Leu

<220>
<221> MISC_FEATURE
10 <222> (16) .. (16)
<223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
<221> MOD_RES
15 <222> (20) .. (20)
<223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con [(2-(2-Amino-etoxi)-etoxi)-acetil]2-(gamma Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H, en la que a es 2 y b es 14 a 24

<220>
<221> MISC_FEATURE
20 <222> (24) .. (24)
<223> Xaa en la pos. 24 es Glu

<220>
<221> MISC_FEATURE
25 <222> (29) .. (29)
<223> Xaa en la pos. 29 es Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
30 <222> (30) .. (30)
<223> Xaa en la pos. 30 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado

35 <400> 16

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

40

	Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Leu	Glu	Xaa	Xaa
				20					25					30

45 <210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> constructo sintético

<220>
<221> MISC_FEATURE
55 <222> (2) .. (2)
<223> Xaa en la pos. 2 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>
<221> MISC_FEATURE
60 <222> (7) .. (7)
<223> Xaa en la pos. 7 es Thr

<220>
<221> MISC_FEATURE
65 <222> (16) .. (16)

<223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa Aminoisobutírico

<220>

<221> MOD_RES

5 <222> (20) .. (20)

<223> Xaa en la pos. 20 es Lys, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H, en la que a es 1 y b es 14 a 24

10 <220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24) .. (24)

<223> Xaa en la pos. 24 es Ala

15 <220>

221> MISC_FEATURE

222> (29) .. (29)

223> Xaa en la pos. 29 es Glu

20 <220>

221> MISC_FEATURE

222> (30) .. (30)

223> Xaa en la pos. 30 está ausente

25 400> 17

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

30

Lys	Lys	Ala	Xaa	Glu	Phe	Val	Xaa	Trp	Leu	Leu	Glu	Xaa	Xaa
			20					25					30

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto agonista del receptor de glucagón que comprende la fórmula:
 $YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$
 en la que
 X_1 es Aib;
 X_2 es T;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral
 K con $[(2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$, en la que a es 1 y b es 18;
 X_5 es A;
 X_6 es E; y
 X_7 está ausente;
 (SEQ ID NO: 12);
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. Un compuesto agonista del receptor de glucagón que consiste en la fórmula:
 $YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$
 en la que
 X_1 es Aib;
 X_2 es T;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral
 K con $[(2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$, en la que a es 1 y b es 18;
 X_5 es A;
 X_6 es E; y
 X_7 está ausente;
 (SEQ ID NO: 12);
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
3. Un compuesto agonista del receptor de glucagón que comprende la fórmula:
 $YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$
 en la que
 X_1 es Aib;
 X_2 es T;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral
 K con $[(2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$, en la que a es 1 y b es 16;
 X_5 es A;
 X_6 es E; y
 X_7 está ausente;
 (SEQ ID NO: 11);
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
4. Un compuesto agonista del receptor de glucagón que consiste en la fórmula:
 $YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$
 en la que
 X_1 es Aib;
 X_2 es T;
 X_3 es Aib;
 X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral
 K con $[(2-(2\text{-Amino-etoxi-etoxi})\text{-acetil})_2-(\gamma\text{Glu})_a\text{-CO}-(\text{CH}_2)_b\text{-CO}_2\text{H}]$, en la que a es 1 y b es 16;
 X_5 es A;
 X_6 es E; y
 X_7 está ausente;
 (SEQ ID NO: 11);
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
5. El agonista del receptor de glucagón según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en terapia.
6. El agonista del receptor de glucagón según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, para uso en el tratamiento del hígado graso en una vaca lechera.
7. Una composición farmacéutica que comprende el agonista del receptor de glucagón según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. El agonista del receptor de glucagón según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la actividad del agonista del receptor de glucagón en el receptor de glucagón es al menos 100 veces mayor que la potencia del agonista del receptor de glucagón en el receptor GLP-1.