

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 822 994**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/28	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01)
A61K 38/00	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/64	(2007.01)
A61K 47/54	(2007.01)
C07K 14/62	(2006.01)
C07K 14/605	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2015 PCT/US2015/051728**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **31.03.2016 WO16049190**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2015 E 15845481 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3206710**

(54) Título: **Conjugados de incretina-insulina**

(30) Prioridad:

24.09.2014 US 201462054666 P

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

05.05.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**LIU, FA;
DIMARCHI, RICHARD D.;
MAYER, JOHN P. y
SMILEY, DAVID L.**

(74) Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 822 994 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

Conjugados de incretina-insulina

5 REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS:

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad según 35 USC§119 (e) DE la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 62/054,666 presentada el 14 de septiembre del 2014

10 ANTECEDENTES

[0002] La insulina es una terapia probada para el tratamiento de la diabetes de aparición juvenil y la diabetes de aparición tardía en la edad adulta. El péptido se biosintetiza como un precursor lineal más grande de baja potencia (aproximadamente del 2% al 9% de la insulina nativa), llamado proinsulina. La proinsulina se convierte proteolíticamente en insulina mediante la eliminación selectiva de un péptido de conexión de 35 residuos (péptido C). El heterodúplex resultante formado por enlaces disulfuro entre la cadena "A" (SEQ ID NO: 1) y la cadena "B" (SEQ ID NO: 2) de la insulina, que representa un total de 51 aminoácidos, tiene una alta potencia para el receptor de insulina (rango de nM). La insulina nativa tiene una afinidad selectiva aproximadamente cien veces mayor por el receptor de insulina en relación con el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina 1 relacionado, pero demuestra poca selectividad por las dos isoformas diferentes del receptor de insulina, denominadas A y B.

[0003] Las incretinas son un grupo de hormonas gastrointestinales que están involucradas en una amplia variedad de funciones fisiológicas, incluyendo homeostasis de la glucosa, la secreción de insulina, el vaciado gástrico, y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos. El preproglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa en diferentes tejidos para formar varios péptidos diferentes. Las incretinas incluyen varios péptidos derivados del proglucagón, incluido el glucagón (SEQ ID NO: 701), el péptido 1 similar al glucagón (GLP-1; los aminoácidos 7-36 se proporcionan como SEQ ID NO: 703 y los aminoácidos 7-35 como SEQ ID NO: 704), péptido-2 similar al glucagón (GLP-2; SEQ ID NO: 708) y oxintomodulina (OXM; SEQ ID NO: 706).

[0004] El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 33 a través de 61 de pre-proglucagón, mientras que el GLP-1 se produce como un-amino 37 péptido ácido que corresponde a los aminoácidos 72 a 108 de pre-proglucagón. La amida GLP-1 (7-36) (SEQ ID NO: 703; el terminal Ces una amida de arginina) o el ácido GLP-1 (7-37) (SEQ ID NO: 704; el terminal Ces una glicina) son biológicamente potentes formas de GLP-1, que demuestran una actividad esencialmente equivalente en el receptor de GLP-1.

[0005] El glucagón es una medicina para salvar vidas que se utiliza en el tratamiento agudo de hipoglucemia severa. Se ha informado que la oxintomodulina tiene la capacidad farmacológica para suprimir el apetito y reducir el peso corporal. Los estudios clínicos con agonistas del receptor de GLP-1 o análogos de GLP-1 estabilizados han demostrado que esta familia de péptidos es un tratamiento eficaz para la diabetes de tipo II.

[0006] Además, el polipéptido inhibidor gástrico (GIP) es también conocido como un péptido insulinotrópico dependiente de la glucosa, y es un miembro de la familia de secretina de hormonas. GIP se deriva de una proproteína de 153 aminoácidos codificada por el gen GIP y circula como un péptido de 42 aminoácidos biológicamente activo (SEQ ID NO: 707). El gen GIP se expresa tanto en el intestino delgado como en las glándulas salivales y es un inhibidor débil de la secreción de ácido gástrico. Además de sus efectos inhibidores en el estómago, en presencia de glucosa, GIP mejora la liberación de insulina por las células de los islotes beta pancreáticos cuando se administra en dosis fisiológicas. Se cree que el GIP funciona como un factor entérico que estimula la liberación de insulina pancreática y que puede desempeñar un papel fisiológico en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

[0007] Tal como se describe en el presente documento conjugados se forman entre un péptido de insulina y un incretina, incluyendo por ejemplo un glucagón, GLP-1 o agonista de GIP, un análogo de GLP-1/GIP co-agonista, un análogo de GLP-1/glucagón co-agonista o un triagonista de glucagón/GLP-1/GIP, en el que el conjugado tiene actividad agonista tanto en el receptor de insulina como en el receptor de incretina correspondiente. Más particularmente, se prevé que la conjugación de un péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, GIP, GLP-1 o glucagón) produzca una modificación beneficiosa de la actividad del péptido de insulina. Por ejemplo, se prevé que la unión de un péptido que tiene actividad agonista en el receptor de glucagón a un péptido de insulina potenciará el direccionamiento del conjugado al hígado, ya que el receptor de glucagón se localiza predominantemente en el hígado. Es deseable dirigir el conjugado al hígado ya que el hígado está involucrado principalmente en la producción de glucosa, no en la utilización. Por lo tanto, dirigirse al hígado puede ser un enfoque más seguro para detener la producción de glucosa que cuando la insulina entra en contacto con otros tejidos como el músculo o la grasa, donde además de apagar la producción de glucosa, también estimula el uso de glucosa, lo que conduce a un mayor riesgo de hipoglucemia. Además, hay receptores de glucagón presentes en las células alfa del páncreas. La entrega del complejo a las células alfa puede suprimir la producción adicional de glucagón o hacer que las células alfa sean más

sensibles a la hipoglucemia. Los solicitantes también anticipan que la presencia de glucagón en los conjugados glucagón-insulina puede servir como un amortiguador sobre la actividad de la insulina acoplada para proporcionar una actividad más de línea base y evitar así picos en los niveles de glucosa en sangre.

5 [0008] Del mismo modo, se prevé que los conjugados de péptidos de insulina con otros péptidos relacionados con el glucagón, incluyendo las incretinas GLP-1 y GIP y otros péptidos relacionados que tienen actividad en los receptores de GIP producirán conjugados que tienen propiedades beneficiosas GLP-1 y/o. Por ejemplo, el conjugado GLP-insulina puede dirigirse al hipotálamo para disminuir el apetito y reducir la glucosa en sangre. Alternativa o adicionalmente, el conjugado GLP-insulina puede dirigirse a las células beta para impulsar la respuesta anabólica (aumentar la producción de insulina de las células beta de los islotes).

10 [0009] La incretina-insulina conjugados peptídicos también son adecuados para nuevas mejoras estructurales que se prevén para producir mejorado índice terapéutico, mediante el uso de la química de profármaco; duración prolongada de la acción, mediante unión de proteínas plasmáticas tales como albúmina, u otras modificaciones, incluyendo pegilación y lipidación (por ejemplo, adición de grupos alquilo o acilo C14-C30); y estabilidad física mejorada, por glicosilación. La preparación de análogos de insulina de cadena única utilizando un enlazador de péptido Ctambién proporciona una nueva ubicación estructural en la que muchas de estas modificaciones químicas pueden implementarse con éxito. Un uso de los conjugados de insulina descritos en este documento sería en el tratamiento de la diabetes mientras se estimula la pérdida de peso o se previene el aumento de peso.

15 [0010] El documento WO 2014/158900 A1 describe péptidos agonistas de insulina conjugados con incretinas en los que el conjugado de insulina/incretina tiene actividad agonista tanto en el receptor de insulina como en el receptor de incretina correspondiente. En particular, el término carboxi del péptido relacionado con glucagón está unido covalentemente al término amino de la cadena B del péptido de insulina.

20 [0011] J. Vora "La combinación de la incretina basados Terapias con insulina: realizar el potencial en la diabetes tipo 2", Diabetes Care, vol. 36, no. Supplement_ 1, 23 de julio de 2013, páginas S226-S232, describe que la combinación de terapias basadas en incretinas con insulina basal proporciona acciones complementarias, reduciendo tanto la PPG como la FPG, para mejorar el control glucémico en la diabetes tipo 2.

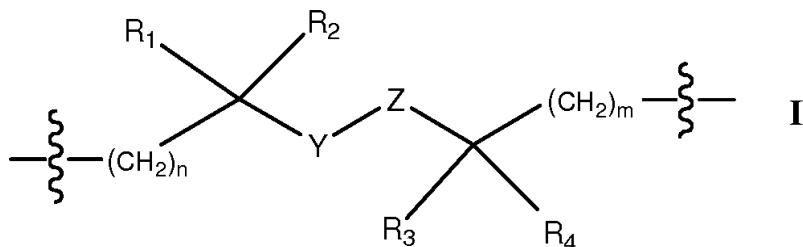
25 [0012] Arun K., Jain et al. "Profármacos mutuos que contienen enlazadores disulfuro biodescindibles y liberables por fármacos", BIOORGANIC CHEMISTRY, vol. 49, 1 de agosto de 2013, páginas 40-48, describen el diseño y la síntesis de varios ejemplos representativos de nuevos profármacos mutuos que contienen nueve tipos distintos de enlazadores disulfuro autoinmolantes liberables por fármacos con enlaces uretano, éster, carbonato o imida entre el enlazador y dos fármacos que contienen amina/amida/urea (primaria o secundaria) o carboxilo o hidroxilo (incluidos los fenólicos).

CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

30 [0013] La presente invención se refiere a un conjugado de incretina-insulina y un derivado profármaco del mismo, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado, TAL como se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere además a un conjugado de incretina-insulina y a una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de la diabetes.

35 [0014] Una insulina agonista/incretina conjugado se proporciona en el que el conjugado tiene actividad agonista en tanto el receptor de insulina y el correspondiente incretina receptor. Más particularmente, en una realización se proporciona un conjugado de agonista de insulina/incretina en el que el conjugado tiene actividad agonista tanto en el receptor de insulina como en el receptor de GLP-1 y/o GIP. De acuerdo con una realización, se proporciona un único compuesto como un conjugado de una proteína de insulina y una proteína de incretina, en el que el conjugado actúa como un agonista de insulina de potencia completa que induce la pérdida de peso o previene el aumento de peso. El componente de péptido de insulina del conjugado puede ser insulina nativa o cualquier análogo de insulina conocido que tenga actividad en el receptor de insulina, incluyendo, por ejemplo, cualquier péptido de insulina descrito en las solicitudes internacionales publicadas WO96/34882, WO 2010/080607, WO 2010/080609, WO 2011/159882, WO/2011/159895 y Patente de Estados Unidos Nº 6.630.348. El componente incretina del conjugado puede ser cualquier péptido de incretina como se describe en el presente documento incluyendo, por ejemplo, glucagón nativo, GLP-1, GIP o cualquier incretina o péptido de incretina conocido que tenga actividad en uno o más receptores de incretina. Los péptidos de incretina adecuados para su uso de acuerdo con esta descripción incluyen, por ejemplo, cualquier péptido de incretina descrito en las solicitudes internacionales publicadas WO 2009/155258, WO 2009/058734, WO 2011/094337, WO 2009/148089, WO 2011/163473 y WO 2010/071807.

40 [0015] De acuerdo con una forma de realización un péptido de incretina está ligado a un péptido de insulina a través de un resto de unión de la estructura general de fórmula I:

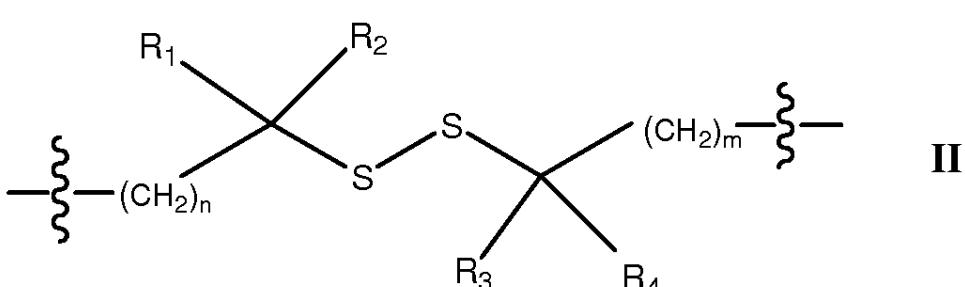


donde R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₃; Y es C, S, Se o S=O,

Z es C, S, Se, -S (C₁-C₃) (arilo C₅-C₆) -, o Z en combinación con Y es-C-, -O-, o un 1,2,3 triazol;

n es 0 o 1; y

15 m es 1, 2 o 3, con la condición de que cuando Y es O, Z es C. En una realización, el resto de unión es un ligador de disulfuro de la fórmula general:



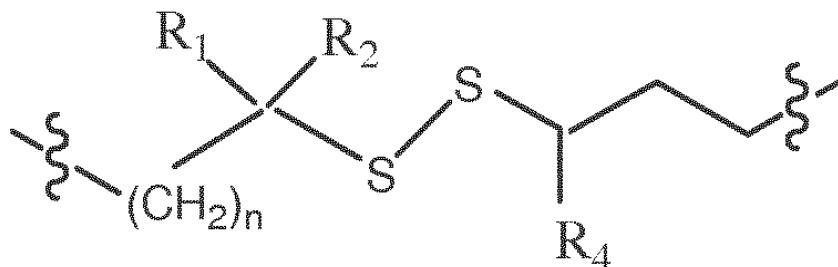
en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ son seleccionado independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₃, n es 0 o 1, y m es 1, 2 o 3. En una realización n es 0, m es 2, R₄ es H y R₁, R₂ y R₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y metilo.

35 [0016] De acuerdo con conjugados de una forma de realización forman uniendo un péptido de incretina a un péptido de insulina, a través de un resto de unión de fórmula I o II, se proporcionan que demuestran alta potencia, la actividad equilibrada en los respectivos receptores del conjugado, la capacidad de reducción de la glucosa y una mayor pérdida de masa grasa cuando se inyecta en ratones modelo normales y diabéticos. En una realización, la región C-terminal de los péptidos de incretina se une covalentemente, a través de un resto de unión de Fórmula I o II, al péptido de insulina a través de una posición seleccionada independientemente de la cadena lateral de un aminoácido en una posición seleccionada de A9, A14 o A15 de la cadena A, posiciones B1, B2, B3, B10, B22, B28 o B29 de la cadena B, la amina alfa N-terminal de la cadena B, el término carboxi de la cadena A o B y en el cadena lateral de un aminoácido en cualquier posición de un resto de enlace que une la cadena A y la cadena B de un análogo de insulina monocatenario. De acuerdo con una realización, el término carboxi de un péptido de incretina está unido al término N de un péptido de insulina a través del resto de enlace disulfuro de Fórmula II, opcionalmente en donde el término carboxi de un péptido de incretina está ligado al término N del péptido de incretina. Cadena B de un péptido de insulina de dos cadenas a través del resto de enlace disulfuro de Fórmula II.

40 [0017] Tal como se utiliza en el presente documento referencia a la región C-terminal del péptido de incretina se pretende que abarque el C-terminal nativo de un glucagón, péptido GLP-1 o GIP, o cualquier aminoácido añadido al extremo C-terminal nativo de una glucagón, GLP-1 o análogo de GIP, o el aminoácido C-terminal de un análogo de glucagón que ha sido acortado por los aminoácidos de delección en el C-terminal, respectivamente, con respecto a la secuencia nativa de glucagón. Por ejemplo, el extremo C-terminal del péptido de incretina nativo puede extenderse en 1 a 3 aminoácidos que luego se unen al péptido de insulina a través de la cadena lateral de un aminoácido de la región C-terminal o mediante el grupo carboxi C-terminal. En una realización, la región carboxi terminal del péptido de incretina está unida covalentemente a la región amino terminal de la cadena B del péptido de insulina.

45 [0018] En una realización, el péptido de insulina del conjugado es un análogo de insulina de dos cadenas que comprende una cadena de la cadena y B A unidos entre sí mediante enlaces disulfuro. En una realización adicional, el conjugado comprende un análogo de insulina de dos cadenas en el que un péptido de incretina está unido covalentemente al péptido de insulina en una posición seleccionada del grupo que consiste en el extremo amino de la cadena B, la región carboxi terminal de la cadena A, y la región carboxi terminal de la cadena B. En una realización, el péptido de incretina está unido al péptido de insulina mediante un resto de unión a disulfuro de la

estructura general:



15

en la que R₁, R₂ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃; y n es 0 o 1.

[0019] En una realización, el péptido de incretina se selecciona del grupo que consiste en glucagón natural, GLP-1 nativo y GIP nativo. En una realización, el péptido de incretina es un análogo de glucagón que tiene actividad en dos o más receptores de incretina seleccionados entre el receptor de glucagón, el receptor de GLP-1 o el receptor de GIP. En una realización, el componente de péptido de incretina del conjugado comprende

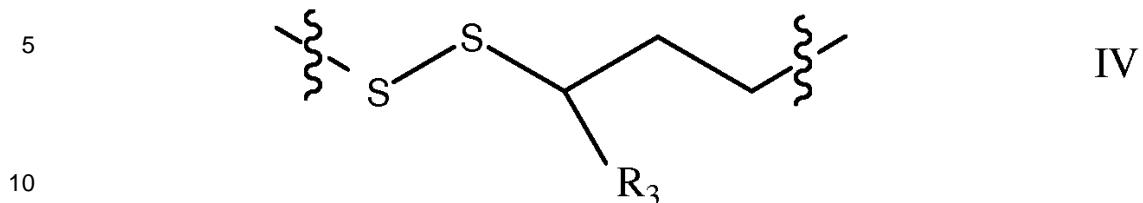
- (i) la secuencia de aminoácidos:
X₁-X₂-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Z (SEQ ID NO: 839) con 1 a 3 modificaciones de aminoácidos a la misma, en la que
X₁ y/o X₂ es un aminoácido no nativo (con respecto a SEQ ID NO: 701) que reduce la susceptibilidad del péptido de incretina a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
Z se selecciona del grupo que consiste en-COOH, -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 78) e Y-COOH, donde Y es de 1 a 2 aminoácidos, y además en la que
 - (1) un puente de lactama conecta las cadenas laterales de la posición i de un aminoácido y la posición i + 4 de un aminoácido, donde i es 12, 16, 20 o 24 o
 - (2) uno, dos, tres o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del péptido de incretina están sustituidos con un aminoácido α, α-disustituido;
- y dicho péptido de incretina tiene actividad agonista de glucagón;
- (ii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 701 modificada para comprender al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:
sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado;
sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico;
sustitución en la posición 28 con Asn, Asp o Glu;
sustitución en la posición 28 con Asp;
sustitución en la posición 28 con Glu;
sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado;
sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico;
sustitución en la posición 29 con Asp, Glu o Lys;
sustitución en la posición 29 con Glu;
inserción de 1-3 aminoácidos cargados después de la posición 29;
inserción después de la posición 29 de Glu o Lys;
inserción después de la posición 29 de Gly-Lys o Lys-Lys; o una combinación de los mismos;
y al menos una modificación de aminoácidos seleccionada del Grupo A o Grupo B, o una combinación de las mismos;
- en la que el Grupo A es una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en la sustitución de Asp en la posición 15 con Glu y la sustitución de Ser en la posición 16 con Thr o AIB; y
en la que el Grupo B es una modificación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
sustitución de His en la posición 1 con un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad del péptido de incretina a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
- sustitución de Ser en la posición 2 con un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad del péptido de incretina a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
sustitución de Tyr en la posición 10 por Phe o Val;
sustitución de Lys en la posición 12 por Arg;
sustitución de Gln en la posición 20 por Ala o AIB;
sustitución de Asp en la posición 21 por Glu;

- sustitución de Gln en la posición 24 por Ala o AIB;
 sustitución de Met en la posición 27 por Leu o Nle;
 delección de aminoácidos en las posiciones 27-29;
 delección de aminoácidos en las posiciones 28-29;
 5 delección del aminoácido en las posiciones 29;
 o una combinación de las mismas;
 y en el que dicho péptido de incretina tiene actividad agonista de glucagón;
- (iii) un péptido de incretina de SEQ ID NO: 701, modificado para comprender
 10 (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,
 (b)
 (1) un puente de lactama entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones i e i + 4 o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones j y j + 3, donde i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y donde j es 17, o
 15 (2) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo están sustituidos con un aminoácido α, α-disustituido,
 (c) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, y
 (d) 1-6 modificaciones de aminoácidos adicionales,
 en las que la CE50 del análogo para la activación del receptor de GIP es aproximadamente 10 nM o menos;
- 20 (iv) la secuencia de X₁X₂X₃GTFSDX₁₀SX₁₂YLX₁₅X₁₆X₁₇X₁₈A₁₉X₂₀X₂₁F₂₂X₂₃X₂₄WLX₂₇X₂₈X₂₉ (SEQ ID NO: 1926), en la que
 X₁ se selecciona del grupo que consiste en His, D-His, (Des-amino) His, hidroxil-His, acetil-His, homo-His o ácido alfa,alfa-dimetilimidazol acético (DMIA), N-metil His, alfa-metil His y ácido imidazol acético;
 25 X₂ se selecciona del grupo que consiste en Ser, D-Ser, Ala, D-Ala, Val, Gly, N-metil Ser, ácido aminoisobutírico (Aib) y N-metil Ala;
 X₃ se selecciona del grupo que consiste en Gln, Glu, Orn y Nle;
 X₁₀ se selecciona del grupo que consiste en Tyr, Val y Trp;
 X₁₂ se selecciona del grupo que consiste en Ser, Lys y Arg;
 30 X₁₅ se selecciona del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico;
 X₁₆ se selecciona del grupo que consiste en Ser, Gly, Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico;
 X₁₇ se selecciona del grupo que consiste en Arg, Gln, Lys, Cys, Orn, homocisteína y acetilfenilalanina;
 X₁₈ se selecciona del grupo que consiste en Arg, Ala, Lys, Cys, Orn, homocisteína y acetil fenilalanina;
 X₂₀ se selecciona del grupo que consiste en Gln, Lys, Arg, Orn y Citrulina;
 35 X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en Gln, Glu, Asp, Lys, Cys, Orn, homocisteína y acetil fenilalanina;
 X₂₃ se selecciona del grupo que consiste en Val e Ile;
 X₂₄ se selecciona del grupo que consiste en Ala, Gln, Glu, Lys, Cys, Orn, homocisteína y acetil fenilalanina;
 X₂₇ se selecciona del grupo que consiste en Met, Val, Leu y Nle;
 X₂₈ se selecciona del grupo que consiste en Asn, Lys y Asp; y
 40 X₂₉ se selecciona del grupo que consiste en Thr, Gly, Lys, Cys, Orn, homocisteína y acetil fenilalanina; o un análogo de SEQ ID NO: 1926, en el que dicho análogo difiere de SEQ ID NO: 1926 por 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos, seleccionadas entre las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28 y 29, en la que dicho péptido de incretina exhibe al menos el 20% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1;
- 45 (v) un aminoácido que difiere de la SEQ ID NO: 701 en no más de diez modificaciones de aminoácidos, que comprende una o más sustituciones de aminoácidos con AIB en las posiciones 16, 20, 21 y/o 24, y una modificación de aminoácidos en la posición 1 y/o 2 que proporciona una susceptibilidad reducida a la escisión por dipeptidil peptidasa IV, en la que dicho péptido de incretina exhibe al menos un 20% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1. En una realización, el péptido de incretina comprende un péptido de cualquiera de (ii) a (v) en el que el péptido se modifica adicionalmente para comprender una extensión C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820).
- [0020] De acuerdo con una realización, el componente de la incretina del conjugado comprende la secuencia X₁X₂X₃GTFX₇SDX₁₀SX₁₂YLX₁₅X₁₆X₁₇AAX₂₀X₂₁FVX₂₄WLLX₂₈X₂₉ (SEQ ID NO: 2029), en la que
 X₁ es Tyr o His;
 55 X₂ es Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina, ácido aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina o D-alanina, opcionalmente X₂ es Aib;
 X₃ es Glu o Gln;
 X₇ es Thr o Ile;
 X₁₀ es Lys, Tyr o Val;
 60 X₁₂ es Ser, Lys, Arg o Ile;
 X₁₅ es Glu o Asp;
 X₁₆ es Glu o Lys;
 X₁₇ es Gln o Arg;
 X₂₀ es Gln o Aib;
 65 X₂₁ es Glu o Asp;

X₂₄ es Asn, Gln o Ala;
 X₂₈ es Ala, Glu, Asp; y
 X₂₉ es Ala o Gly.

- 5 [0021] En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139 y SEQ ID NO: 140 o un análogo de la misma que difiere de SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140 por 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones de aminoácidos. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 139 o SEQ ID NO: 140 por 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO 1991-1995, 2000, 2001, 2007, 2008-2021 y 2024-2028. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2019, SEQ ID NO: 2021, SEQ ID NO: 2027 y SEQ ID NO: 2028 o un análogo de la misma que difiere de SEQ ID NO: 2019, SEQ ID NO: 2021, SEQ ID NO: 2027 o SEQ ID NO: 2028 por 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones de aminoácidos. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2019, 2021 y 2024-2028 o una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 2019, 2021 o SEQ ID NO: 2024-2028 por 1, 2 o 3 sustituciones de aminoácidos. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2019 o 2021 o una secuencia que difiere de SEQ ID NO: 2019, 2021 o SEQ ID NO: 2024-2028 por 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2019 o 2021. En una realización, el componente de incretina del conjugado comprende o consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 2019. En una realización, el péptido de incretina comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2037 o 2038.
- 25 [0022] En una realización, el péptido de insulina del conjugado comprende una cadena A y una cadena B en el que dicha cadena A comprende una secuencia GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈YCX₂₁-R₁₃ (SEQ ID NO: 19), y dicha cadena B comprende una secuencia R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (SEQ ID NO: 20), en las que X₄ es ácido glutámico o ácido aspártico;
- 30 X₅ es glutamina o ácido glutámico.
 X₈ es histidina, treonina o fenilalanina;
 X₉ es serina, arginina, lisina, ornitina, o alanina;
 X₁₀ es isoleucina o serina;
 X₁₂ es serina o ácido aspártico;
- 35 X₁₄ es tirosina, arginina, lisina, ornitina o alanina;
 X₁₅ es glutamina, ácido glutámico, arginina, alanina, lisina, ornitina o leucina;
 X₁₇ es ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina, lisina, ornitina o glutamina;
 X₁₈ es metionina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico o treonina;
 X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina, serina, valina, treonina, isoleucina, leucina, glutamina, 40 ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico, histidina, triptófano, tirosina y metionina;
 X₂₅ es histidina o treonina;
 X₂₉ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina y serina;
 X₃₀ se selecciona del grupo que consiste en histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico y ácido cisteico;
- 45 X₃₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico;
 X₃₄ se selecciona del grupo que consiste en alanina y treonina;
 X₄₁ se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico o asparagina;
 X₄₂ se selecciona del grupo que consiste en alanina, ornitina, lisina y arginina;
 X₄₅ es tirosina o fenilalanina;
- 50 R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en AYRPSE (SEQ ID NO: 14), FVNQ (SEQ ID NO: 12), FVKQ (SEQ ID NO: 8), PGPE (SEQ ID NO: 11), un tripéptido glicina-prolina-ácido glutámico, un tripéptido valina-asparagina-glutamina, un dipéptido prolina-ácido glutámico, un dipéptido asparagina-glutamina, glutamina, ácido glutámico y una amina N-terminal; y R₁₃ es COOH o CONH₂.
- 55 [0023] En una realización, el péptido de insulina del conjugado comprende una cadena A y una cadena B, en el que dicha cadena A comprende una secuencia de SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 1 por uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos, y la cadena B comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2),
- 60 FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (SEQ ID NO: 5), FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (SEQ ID NO: 6), o una secuencia de aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 2, 5, 6 o 9 en una, dos o tres sustituciones de aminoácidos.
- 65 [0024] En una realización, el conjugado comprende el péptido de incretina de la SEQ ID NO: 2019, 2021, SEQ ID NO: 2024-2028, 2037 o 2038 unido a través de su extremo carboxi al extremo amino terminal de un péptido de

insulina que comprende una cadena A de SEQ ID NO: 1 y una cadena B de la SQ ID NO: 2, 5, 6, o 9 a través de un enlazador que comprende la estructura general de la fórmula IV:



en la que R₃ es H o CH₃.

- 15 [0025] En una realización, el conjugado incretina-insulina comprende un resto hidrófilo vinculado a la alfa amina N-terminal de la cadena B o a la cadena lateral de un aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste de A9, A14 y A15 de la cadena A o las posiciones B1, B2, B10, B24, B28 o B29 de la cadena B oa una cadena lateral de un aminoácido del resto de unión en un análogo de insulina de cadena única. Alternativamente, o además, se puede unir un resto hidrófilo al péptido de incretina en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 20, 23, 24, 27, 30, 32, 43 o la región C-terminal. En una realización, la cadena lateral de uno o dos aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre las posiciones 24, 30 o 40 del péptido de incretina, o las posiciones B24, B28 o B29 del péptido de insulina están unidas a un resto hidrófilo.
- 20 [0026] En una realización, el resto hidrófilo es una cadena de polietileno y en una realización adicional, la cadena de polietileno está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido de la fracción de enlace del componente de péptido de insulina, cuando el péptido de insulina es una única cadena de análogo de insulina. En una realización, el resto hidrófilo es un péptido Fc u otro fragmento de péptido de inmunoglobulina. En una realización, el péptido de insulina es una insulina de cadena única en la que el resto de unión que une las cadenas B y A comprende una secuencia de aminoácidos de no más de 17 aminoácidos de longitud y que comprende la secuencia GYGSSRR(SEQ ID NO: 61), GAGSSRR(SEQ ID NO: 1925) o GYGSSRRAPQT; (SEQ ID NO: 23) En una realización, el enlazador peptídico que une las cadenas B y A se selecciona del grupo que consiste en SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR(SEQ ID NO: 1922), SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQK (SEQ ID NO: 1923).
- 25 [0027] La acilación o alquilación puede aumentar la vida media de los péptidos conjugados incretina-insulina en circulación. La acilación o alquilación puede retrasar ventajosamente el inicio de la acción y/o prolongar la duración de la acción en los receptores de insulina. Los péptidos conjugados de incretina-insulina pueden acilarse o alquilarse en la misma posición de aminoácido en la que se une un resto hidrófilo (incluyendo, por ejemplo, en la posición 8 del resto de enlace que une un análogo de insulina de cadena única), o en una posición de aminoácido diferente. De acuerdo con una realización, los conjugados descritos en el presente documento se acilan en la posición 10, 16, 20, 30 y 40 del péptido de incretina o en la posición B28 o B29 del péptido de insulina. En una realización, los conjugados como se describen en el presente documento se acilan en la posición 10 o 40 del péptido de incretina o en la posición B29 del péptido de insulina, en donde el resto acilante es de tamaño suficiente para unirse a la albúmina en suero.
- 30 [0028] También se incluyen en la presente descripción son las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la incretina-insulina y un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con una realización, se proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquier de los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento, preferiblemente con un nivel de pureza de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden contener un péptido agonista de insulina de cadena única como se describe en este documento a una concentración de al menos 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 20 mg/ml, 21 mg/ml, 22 mg/ml, 23 mg/ml, 24 mg/ml, 25 mg/ml o más. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden soluciones acuosas que se esterilizan y opcionalmente se almacenan dentro de varios envases. En otras realizaciones, las composiciones farmacéuticas comprenden un polvo liofilizado. Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse además como parte de un kit que incluye un dispositivo desecharable para administrar la composición a un paciente. Los contenedores o kits pueden etiquetarse para su almacenamiento a temperatura ambiente o refrigerada.
- 35 [0029] Segundo una realización, se proporciona un procedimiento mejorado de regulación de los niveles de glucosa en sangre en pacientes dependientes de insulina, mientras se aumenta la pérdida de peso o previene la ganancia de peso. El procedimiento comprende las etapas de administrar a un paciente un conjugado de incretina-insulina, en el que el extremo carboxi de la incretina está unido al extremo amino del péptido de insulina mediante un espaciador que tiene la estructura general de Fórmula I, II, III o IV, en una cantidad terapéuticamente eficaz para el control de la
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

diabetes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

- [0030] Figs. 1A y 1B son gráficos que demuestran la actividad de una fusión de GLP-1/insulina (GLP-DP8) (HAEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWLVRGRG-
 5 GPEHLCGAHLVDALYLVCGDRGFYFNDRGAGSSSSRRGIVDECCHRSIDLQENYCde un solo péptido N-700); análogo de insulina en cadena con respecto a análogos de insulina no conjugados: DP25M GPEHLCGAHLVDALYLVCGDRGFYFNDRGAGSSSSRRGIVDECCHRSIDLRRLENYC; SEQ ID NO: 145; A), DP30 (▼); y DP31 (◆) e insulina nativa (◀) en el subtipo de insulina A (Fig. 1A) y los receptores de insulina subtipo B (Fig. 10 1B). El péptido de fusión tiene una potencia de aproximadamente 2,07 nanomoles en el receptor A y aproximadamente 9,9 nanomoles en el receptor de insulina B. La actividad de estos compuestos es significativamente menor que la de la insulina nativa (así como la de otros análogos de insulina no conjugada) que tiene una potencia de aproximadamente 0,5 y 0,76 en los respectivos receptores A y B. La Fig. 2 proporciona la estructura general de enlazadores adecuados para su uso en unir una incretina a un péptido de insulina para formar un conjugado de acuerdo con la presente divulgación. Cada una de las estructuras descritas es adecuada para su uso en el acoplamiento de cualquier incretina descrita en el presente documento a cualquier insulina como se describe en el presente documento. Como se designa en la Fig. 2, la estructura [0.0] también se conoce como "enlace disulfuro de cisteína" y la estructura designada [2,0] también se conoce como "enlace disulfuro de penicilamina".
 15 20 La Fig. 3 proporciona conectores adicionales que se pueden usar para preparar las estructuras genéricas de conjugados de incretina-insulina.
 Figs. 4A-4D proporciona un esquema sintético para sintetizar péptidos de fusión de incretina e insulina. Figs. 5A y 5B son gráficos que demuestran la actividad in vitro de un péptido de fusión GLP-1/insulina (IUB48, SEQ ID NO: 1932) Fig. 5A) y un péptido de fusión glucagón/insulina (IUB496, SEQ ID NO: 521; Fig. 5B) en el receptor de insulina subtipo B. Los péptidos de fusión difieren en función del espaciador que une la incretina y la insulina y se preparan utilizando un enlazador disulfuro, que incluye cisteína (●), homocisteína (▲), penicilamina (▼) y desHis con un enlazador de cisteína (●). Se incluye insulina (■) así como IGF-1 (►). DesHiUB48Ces una incretina modificada por la eliminación del aminoácido histidina N-terminal que elimina la actividad incretina. Se encontró que todas las fusiones de incretina-insulina tenían una alta potencia en el receptor de insulina, similar a la de la insulina nativa. Por tanto, el enlazador proporciona una potencia completa independientemente de fusionar un péptido GLP (Fig. 5A) o un péptido de glucagón (Fig. 5B).
 25 30 Figs. 6A y 6B son gráficos que demuestran la actividad in vitro de un péptido de fusión GLP-1/insulina (IUB48, Fig. 6A) y un péptido de fusión glucagón/insulina (IUB496, Fig. 6B) en el respectivo receptor GLP-1 y el glucagón receptor, en el que la secuencia de GLP-1 es HXEGTFTSDVSSYLEEQAKEFIAWLVKGGPSSGAPPSS (SEQ ID NO: 1932) y la secuencia de glucagón es HSQTFTSDSKYLDSSRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPSS (SEQ ID NO: 521) y el péptido nativo es la insulina. Los péptidos de fusión difieren en función del espaciador que une la incretina y la insulina y se preparan utilizando un enlazador disulfuro, que incluye cisteína (●), homocisteína (▲) y penicilamina (▼) y desHis con un enlazador de cisteína (◀). Se incluye glucagón (■) así como IGF-1 (►). La insulina DesHiUB48Ces una incretina modificada por la eliminación del aminoácido histidina N-terminal, eliminando así la actividad de la incretina. Se encontró que todas las fusiones de incretina-insulina tenían alta potencia en los receptores de GLP-1 y glucagón, con la excepción de la insulina DesHiUB48C, que debido a la deleción del residuo de histidina N-terminal no se esperaría que tuviera actividad en el GLP- 1 y receptores de glucagón. Los conjugados GLP-1-insulina también muestran poca actividad en el receptor de glucagón debido al hecho de que GLP-1 tiene muy poca actividad en el receptor de glucagón. Por lo tanto, los conjugados de incretina-insulina demuestran una potencia total para el componente agonista de GLP-1 o glucagón del conjugado de incretina-insulina en sus respectivos receptores.
 35 40 La figura 7 demuestra la estabilidad relativa del conjugado de incretina-insulina en plasma. Los conjugados de incretina-insulina formados usando una cisteína o un enlazador de penicilamina se incubaron durante 72 horas en plasma, no se produjo degradación significativa y no se detectaron diferencias entre los dos enlazadores usados.
 45 50 La figura 8 es un gráfico que demuestra los resultados de administrar una dosis de 50 nmoles/kg de un conjugado de incretina-insulina a ratones normales. IUB-48 es un agonista de GLP-1 que reducirá los niveles de glucosa en sangre a aproximadamente 60 mg/dL. Cuando IUB-48 se une a la insulina nativa a través de cisteína (◆), penicilamina (●) u homocisteína (■), todos los conjugados reducen los niveles de glucosa en sangre a niveles inferiores a los alcanzados con IUB-48 como único agente activo.
 55 60 Figs. 9A-9B proporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones normales a los que se les administró una dosis de 20 nmoles/kg de un conjugado de incretina-insulina, en el que el componente de incretina o de insulina se ha modificado para eliminar la actividad del péptido de insulina o GLP-1. La figura 9A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental. CIU-001 es un conjugado GLP-1/insulina (en el que el péptido GLP-1 consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1932 y el péptido de insulina es insulina nativa), CIU-004 es CIU-001 modificado para eliminar el N- histidina terminal (SEQ ID NO: 1081) que destruye la actividad de unión al receptor de incretina) y CIU-014 es CIU-001 en la que el extremo C-terminal de la cadena B está unido directamente al N-terminal de la cadena A a través de un minipeg (que destruye la insulina actividad). La figura 9B es un gráfico que presenta los resultados, en el que CIU-004 y CIU-001 (que tienen actividad de insulina) son totalmente potentes para reducir la glucosa en sangre por debajo de 50 mg/dL, en el que el compuesto que carece de actividad de

insulina solo puede reducir la glucosa en sangre a aproximadamente Actividad de 60 mg/dL, consistente con la actividad de GLP-1. Por tanto, los conjugados retienen la actividad de ambos péptidos incluso cuando se fusionan de acuerdo con esta divulgación.

Figs. 10A-10D: La Fig. 10A proporciona las ubicaciones en las que se conjuga la incretina-insulina [que comprende una incretina de: HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSXC(SEQ ID NO: 2029); HXEGTFTSDXSSYLEEQAAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSCSEQ ID NO: 2030];

HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSC(SEQ ID NO: 2031); y HXEGTFTSDXSSYLEEQAAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSXC(SEQ ID NO: 2032)

enlazada a insulina nativa (que tiene una cadena A de SEQ ID NO: 1 y una cadena B de SEQ ID NO: 2) mediante un enlazador disulfuro (- (SS)-CH₂ CH₂ CH₂ -) en el que el enlazador se extiende desde la cisteína C-terminal añadida a la incretina y se une covalentemente a la amina N-terminal de la cadena B de la insulina] se puede modificar adicionalmente para enlazar un grupo acilo o alquilo o una cadena de polietileno para extender la duración de la acción del conjugado de incretina-insulina subyacente. Figs. 10B y 10C proporcionan esquemas sintéticos para preparar los conjugados acilo o incretina-insulina pegilada, respectivamente. La figura 10D proporciona la actividad

de los conjugados de insulina-incretina acilados en los receptores de insulina, GLP-1 y GIP en los que una insulina nativa de dos cadenas está unida a una incretina seleccionada del grupo que consiste en HXEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSC(SEQ ID NO: 2033); HXEGTFTSDK (rEC16) SSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSGC(SEQ ID NO: 2034) y HXEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSGK (rEC16) C(SEQ ID NO: 2035)

Las Figs. 11A-11B proporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones diabéticos a los que se les administró una dosis de 5, 15 o 20 nmoles/kg de un conjugado de incretina-insulina (HXEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSUC(SEQ ID NO: 1927) - (SS)-CH₂ CH₂ CH₂ -B1Insulina (CIU-013)), en el que el resto incretina se ha acilado en la cadena lateral del aminoácido de lisina en la posición 40. En particular, la "U" de SEQ ID NO: 1927 representa una lisina acilada con un grupo acilo C16 mediante un enlazador de ácido gamma glutámico (Lys (γ-Glu-C16)). La figura 11A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental. La figura 11B es un gráfico que presenta los resultados, en el que todas las dosis del compuesto son eficaces para reducir la glucosa en sangre. La figura 11C es un gráfico que mide los niveles iniciales de glucosa en sangre y el cambio en la glucosa en sangre después de la administración del compuesto. Tanto las figuras 11B como 11C demuestran que los conjugados de insulina-incretina lipidos son compuestos muy potentes.

Figs. 12A y 12B proporcionan los resultados de un experimento en el que se administra una segunda dosis del conjugado de incretina-insulina (HXEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSUC(SEQ ID NO: 1927) - (SS)-CH₂ CH₂ CH₂ -B1Insulina (CIU-013)) ratones alimentados 6 horas después de la administración de la primera dosis. La figura 12A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental. La figura 12B es un gráfico que presenta los resultados en los que una segunda administración del conjugado a las 6 horas (CIU-13 10 nmoles/kg (x2) ayuda a reducir la glucosa en sangre de 24 horas y la mantiene en aproximadamente 100 mg/dL, mientras que los ratones no administrada una segunda dosis siguen experimentando un aumento de los niveles de glucosa en sangre.

La figura 13 es un gráfico de barras que muestra que el conjugado de incretina-insulina (HXEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSUC(SEQ ID NO: 1927) - (SS)-CH₂ CH₂ CH₂ -B1Insulina (CIU-013)), está suprimiendo la ingesta de alimentos en la que la insulina pegilada no lo hace. En consecuencia, los conjugados de incretina-insulina basados en GLP-1 tienen actividad para reducir los niveles de glucosa en sangre y reducen la ingesta de alimentos ya que tienen la actividad tanto del GLP-1 como de la insulina.

Figs 14A-14D proporcionan los resultados de un experimento llevado a cabo en ratones diabéticos se administra una insulina pegilado nativo o el conjugado de la incretina-insulina (HXEGTFTSDVSSYLEEQAACEFIawlVKGGPSSGAPPPSUC(SEQ ID NO: 1927) - (SS)-CH₂ CH₂ CH₂ -B1Insulin (CIU-013)), en el transcurso de cuatro días. El conjugado de CIU-13 acilado se administró diariamente o dos veces al día. La figura 14A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental. La figura 14B es un gráfico que presenta los resultados, en el que la insulina pegilada no indujo la pérdida de peso cuando se administró diariamente o dos veces al día, pero el conjugado de CIU-13 acilado produjo una pérdida de peso significativa. La figura 14C es un gráfico que demuestra que el conjugado de CIU-13 acilado suprime la ingesta de alimentos en relación con la administración del análogo de insulina pegilado. La figura 14D es un gráfico que muestra la glucosa en sangre de los ratones después de la administración del conjugado de CIU-13 acilado (diariamente o 2 veces al día) o la administración del análogo de insulina pegilado (diariamente o 2 veces al día). El conjugado de CIU-13 acilado se administra a una quinta parte de la dosis de insulina pegilada, pero parece que no es tan eficaz como la insulina.

Figs. 15A-15C proporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones diabéticos a los que se les administraron cuatro conjugados GLP-1/insulina acilados diferentes. Dos de los compuestos se acilan en la posición 10 (CIU-12 (SEQ ID NO: 1953 y CIU-21 (SEQ ID NO: 1958) y dos de los compuestos se acilan en la posición 40 (CIU-13, SEQ ID NO: 1954); y CIU-22, SEQ ID NO: 1959). El espaciador que une la incretina a la insulina también es diferente entre los compuestos con un enlace disulfuro de cisteína para CIU-12 y CIU-13 y un enlace disulfuro de penicilamina para CIU-21 y CIU-22. La Fig. 15A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental La Fig. 15B es un gráfico que presenta los resultados, en el que todos los compuestos demuestran actividad para reducir los niveles de glucosa en sangre y demuestran una duración de acción prolongada en relación con la insulina nativa. 15C es un gráfico de barras que presenta el área bajo la curva. Los resultados indican una

mayor duración de la acción lograda con la acilación en la posición 10 con respecto a la acilación en la posición 40. No se observa una diferencia significativa entre el enlace disulfuro de cisteína con respecto al enlace disulfuro de penicilamina.

La figuras 16A-16C proporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones diabéticos a los que se administraron tres dosis diferentes (5, 10 o 20 nmol/kg) de un conjugado GLP-1/insulina pegilado (CIU-037). CIU-037 (SEQ ID NO: 1966) se pegila con un PEG 20K en la posición 40 del resto GLP-1. CUI-023 (SEQ ID NO: 1960) se pegila con un PEG 20K en B29 del componente de insulina. A los animales también se les administraron 20 nmol/kg de una insulina nativa pegilada (20 K PEG unido a la cadena lateral B29). La figura 16A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental. La figura 16B es un gráfico que presenta los resultados de la titulación de la dosis, con niveles de glucosa en sangre inversamente proporcionales a la dosis administrada. Los conjugados GLP-1/insulina pegilados reducen los niveles de glucosa en sangre más rápidamente y tienen una duración de acción más prolongada que la insulina pegilada (CIU-26). La Fig. 16Ces un gráfico de barras que indica que los conjugados pegilados que contienen GLP-1 suprimen la ingesta de alimentos mientras que el análogo de insulina pegilado no lo hizo.

Figs. 17A-17E proporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones diabéticos a los que se administraron tres dosis diferentes (1, 2,5 o 5 nmol/kg) de un conjugado GLP-1/insulina pegilado (CIU-037). CIU-037 está pegilado con un PEG 20K en la posición 40 del resto GLP-1. A los animales también se les administró 20 nmol/kg de una insulina nativa pegilada (20 K PEG unido a la cadena lateral B29). La Fig. 17A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental en el que los animales se controlaron durante el transcurso de siete días. La figura 17B es un gráfico que presenta los resultados de la titulación de la dosis, con niveles mejorados de glucosa en sangre alcanzados con respecto a la insulina pegilada y usando menos del 5% de la dosis. La Fig. 17Ces un gráfico que demuestra la capacidad de CIU-037 para suprimir la ingesta de alimentos, mientras que CIU-26, la insulina pegilada, no lo hace. La Fig. 17D es un gráfico que presenta datos que demuestran que CIU-037, pero no CIU-26, induce la pérdida de peso corporal. La Figura 17E es una serie de gráficos de barras que indican que la pérdida de peso inducida por CIU-037 proviene de la masa grasa y no de la masa magra.

Figs. 18A-18Cproporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones diabéticos a los que se administraron tres homodímeros diferentes de conjugados GLP-1/insulina (CIU-070, SEQ ID NO: 1980; CIU-071, SEQ ID NO: 1981; y CIU-072, SEQ ID NO: 1982) relativa a monómeros conjugados GLP-1/insulina (CIU-037, SEQ ID NO: 1966; CIU-056, SEQ ID NO: 1975; CIU-057, SEQ ID NO: 1976). Los conjugados CIU-072 se unen para formar un dímero mediante un disulfuro a través de un tiol que se añade a la cadena lateral de Lys40 en el agonista de GLP. El tiol se deriva de la cistamina (des-amino, Cys) que forma un enlace amida a través de su grupo carboxilo a la amina de lisina. Los conjugados CIU-070 y CIU-071 se unen para formar un dímero mediante un polímero peg bifuncional en ambos extremos. Se forma un enlace amida entre la lisina de cadena lateral y el peg-polímero a través de la formación del enlace amida mediado por N-hidroxisuccinimida. Los péptidos CIU-056 y CIU-057 son monómeros que están doblemente pegilados con dos clavijas de 20 kd en las mismas posiciones K24 y K40 de la secuencia de GLP-1. CIU-037 está pegilado con un PEG 20K en la posición 40 del resto GLP-1. La figura 18A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental. La figura 18B es un gráfico que presenta los resultados de la disminución relativa de glucosa de cada dímero. La figura 18Ces un gráfico que presenta los resultados de la disminución relativa de la glucosa de cada dímero según se presenta en base al cambio en los niveles iniciales de glucosa en sangre a niveles de glucosa en sangre después de la administración.

Figs. 19A-19C proporcionan los resultados de un experimento realizado en ratones diabéticos a los que se les administraron dos formas de profármaco diferentes de un profármaco de insulina (CIU-035 y CIU-036) en el que un elemento dipéptido autoescindible (Aib, N-Me-dLys para CIU-035 y Sar, alfa-MeLys para CIU-036) está unido al extremo N-terminal de CIU-035/CIU-036. Para CIU-035, el elemento dipéptido se une mediante un enlazador disulfuro de fórmula II a la B1 de la insulina. Para CIU-036, el elemento dipéptido se une mediante un enlace amida directo al nitrógeno amina B1. El elemento dipéptido tiene un grupo acilo de C22 o C18 unido a la cadena lateral de lisina del elemento dipéptido. La Fig. 19A proporciona una representación esquemática del procedimiento experimental en el que CIU-035 y CIU-036 se administran en dos dosis diferentes de 10 y 50 nmol/kg. La figura 18B es un gráfico que presenta los resultados de la disminución relativa de glucosa de cada profármaco en relación con la insulina nativa. Los profármacos de insulina administrados a 50 nmol/kg demuestran una rápida disminución de la glucosa en sangre y tienen una duración de acción prolongada en relación con la insulina. La figura 19Ces un gráfico que presenta las primeras seis horas después de administrar los profármacos. Este gráfico representa más claramente la duración prolongada de acción de la forma de profármaco del profármaco de insulina lipídica en relación con la insulina.

La figura 20 es un gráfico de barras que muestra la titulación de la dosis del conjugado de insulina incretina CIU-079 (insulina nativa, coagonista de GIP-GLP, increlina; véase la Tabla 4) en la ingesta de alimentos. CIU-079 exhibe actividad en cada uno de los receptores GIP, GLP-1 e insulina.

La figura 21 es un gráfico de barras que muestra la titulación de la dosis del conjugado de incretina-insulina CIU-085 (des-Di, coagonista de GIP-GLP, increlina; véase la Tabla 4) en la ingesta de alimentos. El análogo de insulina des-Di es una insulina de cadena única formada por la fusión de un extremo de la cadena B modificado (B27 y B29 suprimidos) directamente al extremo N de la cadena A. Este análogo de insulina está inactivo en el receptor de insulina. CIU-085 exhibe actividad en cada uno de los receptores GIP y GLP-1, pero no en el receptor de insulina.

La figura 22 es un gráfico de barras que muestra la titulación de la dosis del conjugado de insulina incretina CIU-093 (insulina nativa, des-Tyr1, coagonista de GIP-GLP, increlina; ver Tabla 4) en la ingesta de alimentos. El análogo des-Tyrlglucagon es inactivo en los receptores GLP-1 y GIP. CIU-085 exhibe actividad solo en el receptor de insulina y

no en ninguno de los receptores GIP y GLP-1. Este conjugado no tiene actividad incretina y por lo tanto no suprime la ingesta de alimentos.

La figura 23 es un gráfico que muestra la titulación de la dosis del conjugado de insulina incretina CIU-079 (insulina nativa, coagonista de GIP-GLP, increlina; véase la Tabla 4) sobre la glucosa en sangre.

5 La figura 24 es un gráfico que muestra la titulación de la dosis del conjugado de insulina incretina CIU-085 (des-Di, coagonista de GIP-GLP, increlina; véase la Tabla 4) sobre la glucosa en sangre.

10 La figura 25 es un gráfico que muestra la titulación de la dosis del conjugado de insulina incretina CIU-093 (insulina nativa, des-Tyr1, coagonista de GIP-GLP, increlina; véase la Tabla 4) sobre la glucosa en sangre. Sin la actividad incretina, se requiere una dosis mucho más alta para obtener la misma disminución de glucosa que se observa con CIU-079 y CIU-085.

15 La Fig. 26 es un gráfico de una prueba de tolerancia a la glucosa realizada en ratones de tipo salvaje (líneas continuas) y en ratones knock out para el receptor de GPL-1 (líneas discontinuas). A los ratones se les administró una dosis de 1 nmol/kg o 3 nmol/kg de conjugado de insulina incretina CIU-079 dos horas antes de una prueba de provocación con glucosa. Los datos demuestran que estos compuestos tienen actividades de incretina (actividad de GLP-1 y GIP) ya que son completamente funcionales en el tipo salvaje y pierden actividad en ratones knock out para GLP-1, pero esa actividad perdida puede superarse mediante una dosis mayor.

20 La Fig. 27 es un gráfico de una prueba de tolerancia a la glucosa realizada en ratones de tipo salvaje (líneas continuas) y en ratones knock out para el receptor de GPL-1 (líneas discontinuas). A los ratones se les administró una dosis de 1 nmol/kg o 3 nmol/kg de conjugado de insulina incretina CIU-085 dos horas antes de una exposición a glucosa. Los datos demuestran que estos compuestos tienen actividades incretinas, actividad GLP-1 y GIP, ya que son completamente funcionales en el tipo salvaje y pierden actividad en ratones con GLP-1 inactivo, pero eso puede superarse con una dosis mayor.

25 La figura 28 es un gráfico de barras que demuestra el efecto de varios conjugados de insulina incretina (CIU-079, CIU-085 y CIU-093) sobre la ingesta de alimentos (FI medido en gramos) cuando se administra en una dosis de 3 nmol/kg ratones tipo o ratones knock out para el receptor GPL-1. La ingesta de alimentos está regulada por GLP-1, por lo que en los ratones knock out para GLP-1 no se observa una reducción en la ingesta de alimentos para ninguno de los compuestos administrados; sin embargo, CIU-079 y CIU-085, pero no CIU-093, suprime la ingesta de alimentos en la naturaleza. ratones tipo.

30 La figura 29 es un gráfico que demuestra el efecto de varios conjugados de incretina-insulina (CIU-079, CIU-085 y CIU-093) sobre la glucosa en sangre cuando se administran a una dosis de 3 nmol/kg a ratones de tipo salvaje.

35 La figura 30 es un gráfico que demuestra el efecto de varios conjugados de incretina-insulina (CIU-079, CIU-085 y CIU-093) sobre la glucosa en sangre cuando se administran a una dosis de 3 nmol/kg a ratones knock out para el receptor GPL-1.

35 La Fig.31 es un gráfico de barras que demuestra el efecto de varios conjugados de insulina incretina (CIU-079, CIU-085 y CIU-093) sobre la ingesta de alimentos (FI medido en gramos) cuando se administra en una dosis de 10 nmol/kg a ratones tipo o ratones knock out para el receptor GPL-1.

40 La Fig. 32 es un gráfico que demuestra el efecto de diversos conjugados de incretina-insulina (CIU-079, CIU-085 y CIU-093) sobre la glucosa en sangre cuando se administran a una dosis de 10 nmol/kg a ratones de tipo salvaje.

45 La Fig. 33 es un gráfico que demuestra el efecto de varios conjugados de incretina-insulina (CIU-079, CIU-085 y CIU-093) sobre la glucosa en sangre cuando se administran a una dosis de 10 nmol/kg a ratones knock out para el receptor GPL-1.

45 La figura 34 es un gráfico que demuestra el efecto de varios conjugados de incretina-insulina (CIU-079, CIU-082, CIU 190, CIU 191, CIU 192 y CIU-225) sobre la glucosa en sangre cuando se administran a una dosis de 3 nmol/kg. a ratones con obesidad inducida por dieta (DIO).

50 Figs. 35A y 35B son gráficos que miden los niveles de glucosa en sangre (Fig.35A) y los niveles de péptido C(Fig.35B) en monos infundidos con glucosa (para elevar los niveles de glucosa; las respuestas de GLP-1 y GIP solo se observan con glucosa en sangre elevada) y administrado CIU 085 por vía subcutánea en una de dos dosis (3 nmol/kg o 10 nmol/kg). CIU 085 que carece de actividad de la insulina es capaz de inducir la producción de péptido C(un marcador de la producción de insulina), demostrando así que estos compuestos tienen actividad incretina en monos.

55 La figura 36 es un gráfico que mide los niveles de glucosa en sangre en cerdos pequeños normales a los que se les administró CIU 085 o CIU079 por vía subcutánea a una dosis de 3 nmol/kg. Esto demuestra que CIU-079 tiene actividad de insulina y reduce la glucosa en sangre, mientras que la capacidad de CIU-085 para reducir la glucosa en sangre es mínima a pesar de que tiene actividad de GLP-1 y GIP.

55 La figura 37 es un gráfico que mide los niveles de insulina en sangre en cerdos pequeños normales a los que se les administró CIU 085 o CIU079 por vía subcutánea a una dosis de 3 nmol/kg. Esto demuestra que CIU-079 se elimina porque está activo en el receptor de insulina; mientras que CIU-085, que no es activo en el receptor de insulina, no se elimina y continúa induciendo la producción de insulina.

60 DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0031] La presente invención se refiere a un conjugado de incretina-insulina y un derivado profármaco del mismo, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere además a un conjugado de incretina-insulina y a una composición farmacéutica que comprende dicho conjugado, tal

como se define en las reivindicaciones, para su uso en el tratamiento de la diabetes.

DEFINICIONES

5 [0032] En la descripción y reivindicaciones de la invención, la siguiente terminología será utilizada de acuerdo con las definiciones expuestas a continuación.

10 [0033] El término "aproximadamente" tal como se utiliza en este documento significa mayor o menor que el valor o rango de valores indicados por 10 por ciento, pero no está destinada a designar cualquier valor o intervalo de valores sólo a esta definición más amplia. Cada valor o rango de valores precedido por el término "aproximadamente" también pretende abarcar la realización del valor absoluto establecido o rango de valores.

15 [0034] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "amino ácido" incluye cualquier molécula que contiene tanto amino y grupos funcionales carboxilo, en el que el amino y grupos carboxilato están unidos al mismo carbono (el carbono alfa). El carbono alfa opcionalmente puede tener uno o dos sustituyentes orgánicos adicionales. Para los propósitos de la presente divulgación, la designación de un aminoácido sin especificar su estereoquímica pretende abarcar la forma L o D del aminoácido, o una mezcla racémica. Sin embargo, en el caso en que un aminoácido se designa por su código de tres letras e incluye un número de superíndice, la forma D del aminoácido se especifica mediante la inclusión de una d minúscula antes del código de tres letras y el número de superíndice (p. Ej., DLys ⁻¹), en donde la designación que carece de la d minúscula (por ejemplo, Lys ⁻¹) pretende especificar la forma L nativa del aminoácido. En esta nomenclatura, la inclusión del número en superíndice designa la posición del aminoácido en la secuencia del análogo de insulina, en la que los aminoácidos que se encuentran dentro de la secuencia del análogo de insulina se designan mediante números en superíndice positivos numerados consecutivamente desde el extremo N-terminal. Los aminoácidos adicionales enlazados al péptido análogo de insulina en el extremo N-terminal o mediante una cadena lateral se numeran comenzando con 0 y aumentando en valor entero negativo a medida que se eliminan más de la secuencia del análogo de insulina.

20 [0035] Tal como se utiliza en este documento, el término "ácido de hidroxilo" se refiere a los aminoácidos que han sido modificados para reemplazar el carbono alfa amino grupo con un grupo hidroxilo.

25 [0036] Tal como se utiliza en este documento, el término "no codificado amino ácido" incluye cualquier aminoácido que no es un L-isómero de cualquiera de los siguientes 20 aminoácidos: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr.

30 [0037] Un "polipéptido bioactivo" se refiere a polipéptidos que son capaces de ejercer un efecto biológico in vitro y/o in vivo.

35 [0038] Tal como se utiliza en el presente documento una referencia general a un péptido está destinado a péptidos Encompass que han modificado extremos amino y carboxi. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que designa los aminoácidos estándar está destinada a abarcar los aminoácidos estándar en los extremos N y C, así como un ácido hidroxílico correspondiente en el extremo N y/o un aminoácido C terminal correspondiente modificado. para comprender un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal.

40 [0039] Tal como se utiliza en el presente documento un "acilado" amino ácido es un ácido amino que comprende un grupo acilo que es no nativo a un origen natural de aminoácidos, independientemente de los medios por los que se produce. Los procedimientos ejemplares para producir aminoácidos acilados y péptidos acilados son conocidos en la técnica e incluyen acilar un aminoácido antes de su inclusión en el péptido o síntesis de péptido seguido de acilación química del péptido. En algunas realizaciones, el grupo acilo hace que el péptido tenga uno o más de (i) una vida media prolongada en la circulación, (ii) un inicio de acción retardado, (iii) una duración de acción prolongada, (iv) una mejora resistencia a proteasas, como DPP-IV, y (v) aumento de potencia en los receptores de péptidos de insulina y/o IGF.

45 [0040] Tal como se utiliza en este documento, un "alquilados" amino ácido es un ácido amino que comprende un grupo alquilo que es no nativo a un origen natural de aminoácidos, independientemente de los medios por los que se produce. Se conocen en la técnica procedimientos ejemplares para producir aminoácidos alquilados y péptidos alquilados que incluyen la alquilación de un aminoácido antes de la inclusión en el péptido o la síntesis del péptido seguido de la alquilación química del péptido. Sin estar sujeto a ninguna teoría en particular, se cree que la alquilación de péptidos logrará efectos similares, si no los mismos, que la acilación de los péptidos, por ejemplo, una vida media prolongada en la circulación, un inicio de acción retardado, una duración prolongada de acción, una resistencia mejorada a las proteasas, como la DPP-IV, y una mayor potencia en los receptores de insulina y/o IGF.

50 [0041] Tal como se utiliza en este documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, tales como una solución salina tamponada con fosfato, agua, emulsiones tales como un aceite/agua o agua/emulsión de aceite, y diversos tipos de agentes humectantes agentes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE.

UU. O enumerados en la Farmacopea de los EE. UU. Para su uso en animales, incluidos los humanos.

[0042] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de compuestos que retienen la actividad biológica del compuesto padre, y que no son biológicamente o de otra manera indeseable. Muchos de los compuestos descritos en este documento son capaces de formar sales ácidas y/o básicas en virtud de la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

[0043] Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen sólo a modo de ejemplo, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, pero no se limitan a, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

[0044] Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico. Las sales derivadas de ácidos orgánicos incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico., ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido salicílico.

[0045] Tal como se utiliza en este documento, el término "resto hidrófilo" se refiere a cualquier compuesto que es fácilmente soluble en agua o fácilmente absorbe el agua, y que son tolerados *in vivo* por las especies de mamíferos sin efectos tóxicos (es decir, son biocompatibles). Ejemplos de restos hidrófilos incluyen polietenglicol (PEG), ácido poliláctico, ácido poliglicólico, un copolímero de ácido poliláctico-poliglicólico, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, polimetoxazolina, polietiloxazolina, polihidroxietil metacrilato, polihidroxipropilamida y metacrilato de estrella, polihidroxipropilamida y polimetacrilamida, como derivado de polimetacrilamida y polimetacrilamida hidroximetilcelulosa, hidroximetil almidón, hidroxietil almidón o hidroxietilcelulosa y copolímeros de los mismos, así como polímeros naturales que incluyen, por ejemplo, Fc, albúmina y otros polipéptidos, heparina y dextrano.

[0046] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratar" incluye la profilaxis del trastorno o condición específica, o alivio de los síntomas asociados con un trastorno o condición específica y/o prevenir o eliminar dichos síntomas. Por ejemplo, como se utiliza en este documento, el término "tratar la diabetes" se referirá en general a mantener los niveles de glucosa en sangre cerca de los niveles normales y puede incluir aumentar o disminuir los niveles de glucosa en sangre dependiendo de una situación dada.

[0047] Tal como se utiliza en el presente documento una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un análogo de insulina se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente de un análogo de insulina para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, un efecto deseado sería la prevención o el tratamiento de la hiperglucemia. La cantidad que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general del individuo, modo de administración. Por tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad efectiva" exacta. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto en la técnica usando experimentación rutinaria.

[0048] El término, significa "parenteral", no a través del canal alimentario, pero por alguna otra vía tal como intranasal, inhalación, subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

[0049] En toda la solicitud, todas las referencias a una posición de aminoácido particular por letra y número (por ejemplo, posición A5) se refieren al aminoácido en esa posición de la cadena A (por ejemplo, posición A5) o de la cadena B (por ejemplo, posición B5). en la respectiva cadena A de insulina humana nativa (SEQ ID NO: 1) o cadena B (SEQ ID NO: 2), o la posición de aminoácido correspondiente en cualquiera de sus análogos. Por ejemplo, una referencia en el presente documento a la "posición B28" en ausencia de cualquier elaboración adicional significaría la posición correspondiente B27 de la cadena B de un análogo de insulina en el que se ha eliminado el primer aminoácido de la SEQ ID NO: 2. De manera similar, los aminoácidos agregados al extremo N de la cadena B nativa se numeran comenzando con B0, seguidos por números de valor negativo creciente (p. Ej., B-1, B-2...) a medida que se agregan aminoácidos al N -término. Alternativamente, cualquier referencia a una posición de aminoácido en el resto de enlace de un análogo de cadena única se hace en referencia a la cadena Cnativa de IGF 1 (SEQ ID NO: 23). Por ejemplo, la posición 9 de la cadena Cnativa (o la "posición C9") tiene un residuo de alanina.

[0050] Tal como se utiliza en el presente documento el término "péptido de insulina nativo" pretende designar el amino heterodúplex ácido 51 que comprende la cadena A de la SEQ ID NO: 1 y la cadena B de la SEQ ID NO: 2, así como la insulina de cadena única análogos que comprenden SEQ ID NOS: 1 y 2. El término "péptido de insulina" como se utiliza en este documento, sin lenguaje descriptivo adicional, pretende abarcar el heterodúplex de 51 aminoácidos que comprende la cadena A de SEQ ID NO: 1 y la cadena B de SEQ ID NO: 2, así como sus análogos de insulina monocatenarios (incluidos, por ejemplo, los descritos en la solicitud internacional publicada WO96/34882 y la patente estadounidense número 6.630.348), incluidos los heterodúplex y los análogos monocatenarios que comprenden análogos modificados del A nativo cadena y/o cadena B y derivados de la misma. Dichos análogos

- modificados incluyen la modificación del aminoácido en la posición A19, B16 o B25 a una 4-amino fenilalanina o una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre A5, A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18., A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B17, B20, B21, B22, B23, B26, B27, B28, B29 y B30 o eliminaciones de cualquiera o todas las posiciones B1- 4 y B26-30. Los péptidos de insulina como se definen en el
- 5 presente documento también pueden ser análogos derivados de una insulina de origen natural mediante la inserción o sustitución de un resto no peptídico, por ejemplo, un fragmento retroinverso, o la incorporación de enlaces no peptídicos como un enlace azapéptido (CO sustituido por NH) o enlace pseudo-peptídico (por ejemplo, NH sustituido con CH₂) o un enlace éster (por ejemplo, un depsipéptido, en el que uno o más de los enlaces amida (-CONHR-) se reemplazan por enlaces éster (COOR)).
- 10 [0051] Un "análogo de insulina A19" es un péptido de insulina que tiene una sustitución de 4-amino fenilalanina o fenilalanina 4-metoxi para el residuo de tirosina nativa en la posición 19 de la cadena A de la insulina nativa.
- 15 [0052] Tal como se utiliza en el presente documento un "IGF ^{B16B17} análogo de péptido" es un término genérico que comprende una cadena A y heterodúplex de cadena B, así como análogos de insulina de cadena única de los mismos, en donde la cadena A comprende la secuencia de péptido de SEQ ID NO: 19 y la cadena B comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20 así como análogos de aquellas secuencias en las que el análogo de la cadena A y/o la cadena B comprende 1-3 sustituciones de aminoácidos adicionales, con la condición de que la cadena B no comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 y comprende una tirosina en la posición B16 y una leucina en la posición
- 20 B17.
- [0053] Un "IGF YL análogo" es un péptido que comprende una cadena de IGF A de SEQ ID NO: 19 y una cadena IGF B de SEQ ID NO: 69.
- 25 [0054] Tal como se utiliza en este documento, el término "una sola cadena de análogo de insulina" abarca un grupo de proteínas estructuralmente relacionadas, en el que la insulina o IGF A y B cadenas, o análogos o derivados de los mismos, están unidas covalentemente entre sí para formar un polipéptido lineal cadena. Como se describe en el presente documento, el análogo de insulina monocatenario comprende el enlace covalente del terminal carboxi de la cadena B al terminal amino de la cadena A a través de un resto de enlace.
- 30 [0055] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena de insulina A", lenguaje descriptivo más ausente pretende abarcar la secuencia de amino ácido 21 de la SEQ ID NO: 1, así como análogos funcionales y derivados de los mismos, incluyendo la cadena A de A19 análogos de insulina y otros análogos conocidos por los expertos en la técnica, incluida la modificación de la secuencia de SEQ ID NO: 1 por una o más inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre A4, A5, A8, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, A21.
- 35 [0056] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena de insulina B", lenguaje descriptivo más ausente se pretende que abarque la 30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, así como análogos funcionales modificadas de la cadena B nativa, incluyendo la modificación de la aminoácido en la posición B16 o B25 a una 4-amino fenilalanina o una o más inserciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B17, B20, B21, B22, B23, B25, B26, B27, B28, B29 y B30 o delecciones de cualquiera o todas las posiciones B1-4 y B26-30.
- 40 [0057] El término "identidad" como se utiliza en el presente documento se refiere a la similitud entre dos o más secuencias. La identidad se mide dividiendo el número de residuos idénticos por el número total de residuos y multiplicando el producto por 100 para lograr un porcentaje. Por tanto, dos copias de exactamente la misma secuencia tienen 100% de identidad, mientras que dos secuencias que tienen delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos entre sí tienen un menor grado de identidad. Los expertos en la técnica reconocerán que varios
- 45 programas de ordenador, como los que emplean algoritmos como BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Altschul et al. (1993) J. Mol. Biol. 215: 403-410) están disponibles para determinar la identidad de secuencia.
- 50 [0058] Los términos "relacionados con el glucagón péptido" y "incretina péptido" se usan indistintamente y dichos términos abarcan péptidos que tienen actividad biológica como agonistas en uno cualquiera o más de la glucagón, receptores de GIP GLP-1, GLP-2, y y comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos un 40% de identidad de secuencia (por ejemplo, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) con al menos uno de glucagón nativo, oxintomodulina nativa, exendina-4 nativa, GLP-1 nativa, GLP-2 nativa o GIP nativa. A menos que se indique lo contrario, cualquier referencia a una posición de aminoácido en un péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, para el enlace de un resto de profármaco, un resto conjugado, un polímero hidrófilo, acilación o alquilación) se refiere a la posición relativa a la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo (SEQ ID NO: 701).
- 55 [0059] Tal como se utiliza en el presente documento referencia a la región C-terminal de un péptido relacionado con glucagón se pretende que abarque el C-terminal nativo de un péptido de glucagón o cualquier aminoácido de una extensión C-terminal de un análogo de glucagón que se ha extendido por la adición de uno o más aminoácidos en el

extremo C-terminal, o el aminoácido terminal de un análogo de glucagón que ha sido acortado por la delección de uno o más aminoácidos, respectivamente, con respecto a la secuencia nativa de glucagón. Se pretende que un péptido de insulina conjugado en la región C-terminal de un péptido relacionado con glucagón incluya enlace a la cadena lateral de un aminoácido de la región C-terminal o enlace a través del resto de ácido carboxílico C-terminal.

5 [0060] El término "agonista de GLP-1" se refiere a un compuesto que estimula la actividad de GLP-1 receptor, medida por la producción de AMPc usando un validado en el ensayo de modelo in vitro, tal como el descrito en el Ejemplo 13 de Internacional publicada No. WO 2007/056362, publicado el 18 de mayo de 2007.

10 [0061] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucagón nativo" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 701, el término "GIP nativo" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 707, y el término "GLP-1 nativo" es un término genérico que designa GLP-1 (7-36) amida (que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 703), ácido GLP-1 (7-37) (que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 704) o una mezcla de esos dos compuestos. Como se utiliza en este documento, una referencia general a "glucagón" o "GIP" o "GLP-1" en ausencia de cualquier designación adicional pretende significar glucagón nativo o GIP nativo o GLP-1 nativo, respectivamente.

20 [0062] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucagón péptido" es un término genérico que designa el péptido similar al glucagón natural de SEQ ID NO: 701, así como derivados modificados que tienen uno o más amino modificaciones de ácido respecto a la secuencia de glucagón nativo, incluyendo opcionalmente sustituciones en las posiciones de aminoácidos 1, 2, 5, 7, 8, 10, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 24, 28 y 29. Generalmente, todas las referencias a una posición de aminoácido en particular por número (por ejemplo, posición 28) se refieren al aminoácido en esa posición en el glucagón nativo (SEQ ID NO: 701) o la posición de aminoácido correspondiente en cualquiera de sus análogos. Por ejemplo, una referencia a la "posición 28" significaría la posición 27 correspondiente para un análogo de glucagón en el que se ha eliminado el primer aminoácido de SEQ ID NO: 701. De forma similar, una referencia a la "posición 28" significaría la posición 29 correspondiente para un análogo de glucagón en el que se ha añadido un aminoácido antes del extremo N de la SEQ ID NO: 701.

30 [0063] Tal como se utiliza en el presente documento el término "péptido GLP-1" es un término genérico que designa GLP-1 nativo como derivados así como modificados que tienen uno o más amino modificaciones de ácido con respecto a la secuencia nativa de GLP-1.

35 [0064] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado" pretende abarcar modificación química de un compuesto (por ejemplo, un aminoácido), incluyendo la modificación química in vitro, por ejemplo mediante la introducción de un grupo en una cadena lateral en una o más posiciones de un polipéptido, por ejemplo, un grupo nitrógeno en un residuo de tirosina, o yodo en un residuo de tirosina, o mediante la conversión de un grupo carboxílico libre en un grupo éster o en un grupo amida, o mediante la conversión de un grupo amino en una amida por acilación, o por acilar un grupo hidroxilo que da lugar a un éster, o mediante alquilación de una amina primaria que da lugar a una amina secundaria o unión de un resto hidrófilo a una cadena lateral de aminoácido. Otros derivados se obtienen por oxidación o reducción de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en el polipéptido.

40 [0065] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "selectividad" de una molécula para un primer receptor con relación a un segundo receptor se refiere a la siguiente relación: EC₅₀ de la molécula en el segundo receptor dividido por el CE₅₀ de la molécula en la primera receptor. Por ejemplo, una molécula que tiene una CE₅₀ de 1 nM en un primer receptor y un EC₅₀ de 100 nM en un segundo receptor tiene selectividad de 100 veces para el primer receptor en relación con el segundo receptor.

45 [0066] Tal como se utiliza en el presente documento un aminoácido "modificación" se refiere a una sustitución de un aminoácido, o la derivación de un aminoácido por la adición y/o eliminación de los grupos químicos a/desde el aminoácido, e incluye la sustitución con cualquier de los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, así como aminoácidos atípicos o no naturales. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos incluyen Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI), ChemPep Inc. (Miami, FL) y Genzyme Pharmaceuticals (Cambridge, MA). Los aminoácidos atípicos pueden adquirirse de proveedores comerciales, sintetizarse de novo o modificarse químicamente o derivatizarse a partir de aminoácidos naturales.

50 [0067] Tal como se utiliza en el presente documento un aminoácido "sustitución" se refiere a la sustitución de un residuo de aminoácido por un residuo de aminoácido diferente.

55 [0068] Tal como se utiliza en este documento, el término "sustitución de aminoácidos conservativa" se define en el presente documento como los intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

I. Pequeños residuos alifáticos, apolares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares cargados negativamente y sus amidas:

Asp, Asn, Glu, Gln, ácido cisteíco y ácido homocisteíco;

III. Residuos polares cargados positivamente:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:

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

V. Residuos aromáticos grandes:

5 Phe, Tyr, Trp, acetilfenilalanina

[0069] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cadena de polietilenglicol" general o "cadena de PEG", se refiere a mezclas de polímeros de condensación de óxido de etileno y agua, en una cadena ramificada o lineal, representado por la fórmula general H (OCH₂ CH₂)_n OH, donde n es al menos 2. Se utiliza "cadena de polietilenglicol" o "cadena PEG" en combinación con un sufijo numérico para indicar el peso molecular medio aproximado de la misma. Por ejemplo, PEG-5.000 se refiere a una cadena de polietilenglicol que tiene un promedio de peso molecular total de aproximadamente 5.000 Dalton.

[0070] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "pegilado" y términos similares se refiere a un compuesto que ha sido modificado a partir de su estado nativo mediante la vinculación de una cadena de polietilenglicol al compuesto. Un "polipéptido pegilado" es un polipéptido que tiene una cadena de PEG unida covalentemente al polipéptido.

[0071] Tal como se utiliza en el presente documento un "enlazador" es un enlace, molécula o grupo de moléculas que se une dos entidades separadas entre sí. Los enlazadores pueden proporcionar un espacio óptimo de las dos entidades o pueden proporcionar además un enlace lábil que permite que las dos entidades se separen entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, restos lábiles a ácidos, restos lábiles a bases y grupos que se pueden escindir enzimas.

[0072] Tal como se utiliza en el presente documento un "dímero" es un complejo que comprende dos subunidades unidas covalentemente entre sí a través de un enlazador. El término dímero, cuando se utiliza en ausencia de cualquier lenguaje calificativo, abarca tanto a los homodímeros como a los heterodímeros. Un homodímero comprende dos subunidades idénticas, mientras que un heterodímero comprende dos subunidades que difieren, aunque las dos subunidades son sustancialmente similares entre sí.

[0073] El término "alquilo C₁-C_n" en la que n puede ser de 1 a 6, como se utiliza en el presente documento, representa un alquilo lineal o ramificado que tiene de uno al número especificado de átomos de carbono. Ctípicos 1-C₆ grupos alquilo incluyen, pero no se limitan a, metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo.

[0074] Los términos "alquenilo C₂-C_n" en el que n puede ser de 2 a 6, tal como se utiliza en el presente documento, representa un ramificado olefínicamente insaturado o grupo lineal que tiene de 2 al número especificado de átomos de carbono y al menos un doble enlace. Ejemplos de dichos grupos incluyen, pero no se limitan a, 1-propenilo, 2-propenilo (-CH₂-CH₂), 1,3-butadienilo, (-CH₂), 1-butenilo (-CHCH₂ CH₃), hexenilo, pentenilo.

[0075] El término "alquinilo C₂-C_n" en el que n puede ser de 2 a 6, se refiere a una insaturado ramificado o grupo lineal que tiene de 2 a n átomos de carbono y al menos un triple enlace. Los ejemplos de tales grupos incluyen, pero no se limitan a, 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo.

[0076] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a un sistema de anillo carbocíclico mono- o bicíclico que tiene uno o dos anillos aromáticos incluyendo fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, indanilo, indenilo. El tamaño del anillo de arilo y la presencia de sustituyentes o grupos de enlace se indican designando el número de carbonos presentes. Por ejemplo, el término "(C₁-C₃ alquil) (C₆-C₁₀ arilo)" se refiere a un arilo de 5 a 10 miembros que está unido a un resto precursor a través de un dos y cincuenta y nueve miembros alquilo de cadena.

[0077] El término "heteroarilo" como se utiliza en el presente documento se refiere a un sistema cíclico mono o cíclico bi- que contiene uno o dos anillos aromáticos y que contiene al menos un nitrógeno, oxígeno, o azufre en un anillo aromático. El tamaño del anillo heteroarilo y la presencia de sustituyentes o grupos de enlace se indican designando el número de carbonos presentes. Por ejemplo, el término "(alquilo C₁-C_n) (heteroarilo C₅-C₆)" se refiere a un heteroarilo de 5 o 6 miembros que está unido a un resto parental mediante una cadena de alquilo de uno a "n" miembros.

[0078] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "halo" se refiere a uno o más miembros del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo, y yodo.

[0079] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" sin más designación se pretende que abarque cualquier vertebrado de sangre caliente de animal domesticado (incluidos, por ejemplo, animales de granja, caballos, gatos, perros y otros animales domésticos) y seres humanos.

[0080] El término "aislado", como se utiliza en el presente documento significa tener ha eliminado de su entorno

natural. En algunas realizaciones, el análogo se elabora mediante procedimientos recombinantes y el análogo se aisla de la célula huésped.

5 [0081] El término "purificado", como se utiliza en este documento se refiere al aislamiento de una molécula o compuesto en una forma que está sustancialmente libre de contaminantes normalmente asociados con la molécula o compuesto en un entorno y un medio nativo o natural después de haber sido aumentado en la pureza como resultado de estar separado de otros componentes de la composición original. El término "polipéptido purificado" se utiliza en el presente documento para describir un polipéptido que se ha separado de otros compuestos que incluyen moléculas de ácido nucleico, lípidos y carbohidratos.

10 [0082] Un "peptidomimético" se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura que es diferente de la estructura general de un péptido existente, pero que funciona de una manera similar al péptido existente, por ejemplo, mediante la imitación de la actividad biológica de ese péptido. Los peptidomiméticos comprenden típicamente aminoácidos naturales y/o aminoácidos no naturales, pero también pueden comprender modificaciones 15 de la estructura del péptido. Por ejemplo, un peptidomimético puede incluir una secuencia de aminoácidos naturales con la inserción o sustitución de un resto no peptídico, por ejemplo, un fragmento retroinverso, o la incorporación de enlaces no peptídicos como un enlace azapéptido (CO sustituido por NH) o enlace pseudo-peptídico (por ejemplo, NH sustituido con CH₂), o un enlace éster (por ejemplo, depsipeptidos, en el que uno o más de los enlaces amida (-CONHR-) se reemplazan por enlaces éster (COOR)). Alternativamente, el peptidomimético puede estar desprovisto 20 de cualquier aminoácido de origen natural.

[0083] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "cargado amino ácido" o "residuo cargado" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que está cargado negativamente (es decir, de-protonado) o positivamente cargada (es decir, protonado) en solución acuosa a pH fisiológico. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteíco, ácido homocisteíco y ácido homoglutámico, mientras que los aminoácidos cargados positivamente incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados incluyen los aminoácidos cargados entre los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente 25 en las proteínas humanas, así como los aminoácidos atípicos o no naturales.

30 [0084] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido que comprende un segundo resto ácido (distinto del ácido alfa carboxílico del aminoácido), incluyendo por ejemplo, un grupo ácido sulfónico o un ácido carboxílico de cadena lateral.

35 [0085] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" sin más designación se pretende que abarque cualquier animal domesticado vertebrado de sangre caliente (incluidos, por ejemplo, animales de granja, caballos, gatos, perros y otros animales), mamíferos y seres humanos.

ABREVIATURAS:

40 [0086] Los análogos de insulina se abrevian de la siguiente manera:

El cadenas A y B de insulina A y serán designados por una A mayúscula para la cadena A y una B mayúscula para la cadena B. Las modificaciones que se desvían de la secuencia de IGF e insulina nativa se indican entre paréntesis después de la designación de la cadena A o B (p. Ej., [B¹ (H5, H10, Y16, L17): A¹ (H8, N18, N21)]) con la abreviatura del aminoácido de una sola letra que indica la sustitución y el número que indica la posición de la 45 sustitución en la cadena A o B respectiva, utilizando la numeración de insulina nativa. Unos dos puntos entre las cadenas A y B indican una insulina de dos cadenas, mientras que un guión indicará un enlace covalente y, por lo tanto, un análogo de una sola cadena. En los análogos de cadena única, se incluirá un resto de enlace entre las cadenas A y B y la designación C¹ se refiere al péptido de IGF 1 Cnativo, SEQ ID NO: 23. La designación "posición 50 C8" en referencia al resto de enlace designa un aminoácido ubicado en la posición correspondiente al octavo aminoácido de SEQ ID NO: 23.

REALIZACIONES

55 En el presente documento se describen conjugados de un péptido de insulina y un péptido relacionado con glucagón (una incretina) en los que el conjugado tiene actividad para reducir los niveles de glucosa en sangre así como para inducir la pérdida de peso en un paciente. Los conjugados de incretina-insulina (increlinas) pueden formarse como fusiones de péptidos en las que el extremo carboxílico de la incretina está unido a la cadena B del péptido de insulina. Se ha encontrado que tales compuestos exhiben actividad tanto en la insulina como en los respectivos receptores de incretinas. Sin embargo, tales conjugados tienen una actividad sustancialmente reducida en el receptor de insulina (ver Fig. 1).

60 [0088] Los solicitantes han encontrado que el uso de un no péptido lineal espaciador para enlazar una incretina a la insulina produce un conjugado que tiene plena potencia en el receptor de la insulina y en el receptor increlin. En particular, se han descrito previamente análogos de glucagón que exhiben actividad coagonista en los receptores de GLP-1 y glucagón, o en los receptores de GLP-1 y GIP, o actividad tri-agonista en los receptores de glucagón, GLP-

1 y GIP. Esta actividad coagonista y/o triagonista del análogo de glucagón se retiene, así como la actividad del receptor de insulina, en los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento. Ventajosamente, las increlinas descritas en este documento tienen la capacidad de reducir la glucosa en sangre e inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso. En una realización, los conjugados de incretina-insulina como se describen en el presente documento tienen al menos 10 a 200, 50 a 150 o 70 a 100% de la actividad de la insulina nativa en el receptor de insulina, más particularmente en el receptor de insulina subtipo B. En una realización, los conjugados de incretina-insulina como se describen en este documento tienen al menos 10 a 200, 50 a 150, o 70 a 100% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, y/o al menos 10 a 200, 50 a 150, o 70 a 100% de la actividad de GIP nativo en el receptor de GIP. En una realización, los conjugados de incretina-insulina que se describen en el presente documento tienen actividad sub-nanomolar en los receptores GLP-1 y GIP según el ensayo in vitro del Ejemplo 9 y actividad nanomolar en el receptor de insulina subtipo B según el ensayo in vitro. del ejemplo 10.

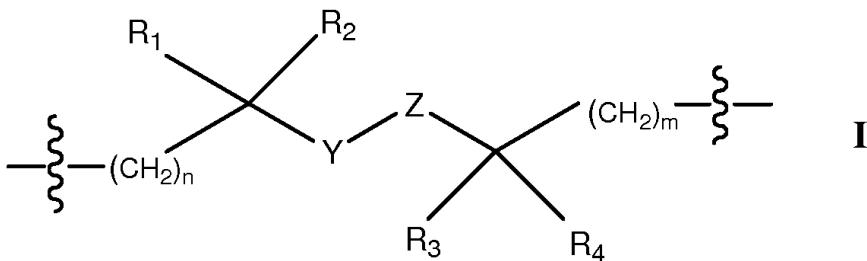
[0089] De acuerdo con una realización, el terminal carboxi de la incretina está unido mediante un espaciador a 1) la cadena lateral de un aminoácido en la posición A14 o A15 de la cadena A, 2) el terminal N amino de la cadena B, 3) en la cadena lateral de un aminoácido en la posición B1, B3, B10, B22, B28 o B29 de la cadena B, o 4) en el aminoácido de la cadena lateral de cualquier posición del resto de enlace de una insulina de cadena única cosa análoga. De acuerdo con una realización, el término carboxi de la incretina está unido mediante un espaciador al extremo N-terminal amino de la cadena B del péptido de insulina o a la cadena lateral del aminoácido B28 o B29. De acuerdo con una realización, el extremo carboxi de la incretina se une mediante un espaciador a la amina N-terminal de la cadena B del péptido de insulina.

[0090] De acuerdo con una realización, se proporciona un conjugado de incretina-insulina, que comprende la estructura general WYZ, donde W es una incretina, Z es un péptido de insulina e Y es un espaciador que une covalentemente W a la Z. La incretina péptido puede ser cualquier de las incretinas conocidas que incluyen, por ejemplo, glucagón nativo, GLP-1 o GIP, o un análogo agonista de glucagón, GLP-1 o GIP, que incluye un coagonista de glucagón/GLP-1, un coagonista de GIP/GLP-1 agonista y un tri-agonista de glucagón/GIP/GLP-1. El péptido de insulina puede ser cualquier insulina o análogo de insulina conocido, incluidos análogos de insulina de cadena única y bicatenaria. El espaciador que une los péptidos de insulina y de incretina se puede seleccionar de cualquiera de los conectores conocidos que son compatibles con los péptidos de unión entre sí. En una realización, el espaciador comprende un resto, seleccionado del grupo que consiste en: amino, éter, tioéster, maleimido, disulfuro, selenoéter, diselenio, amida, éster, tioéster, alqueno, cicloalqueno, alquino, trizoilo, carbamato, carbonato, catepsina B - escindible, oxima e hidrazona, dentro de la columna vertebral de la cadena de enlace.

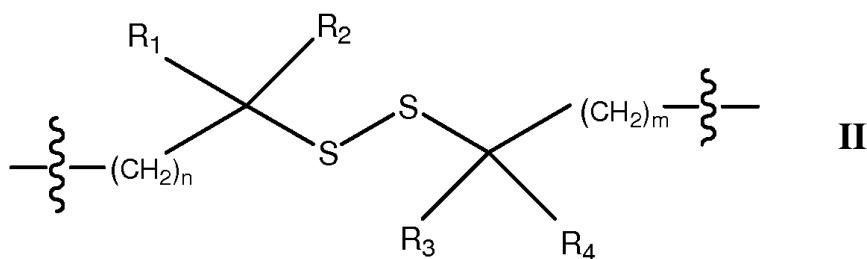
[0091] En algunas realizaciones, el espaciador (Y) comprende una cadena de átomos de 3 a 50, 3 a 25, 5 a 10 o de 6 a 8 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena en la cadena principal del enlazador se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N y S. Los átomos de la cadena y los enlazadores pueden seleccionarse de acuerdo con su solubilidad esperada (hidrofilicidad) para proporcionar un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, Y proporciona un grupo funcional que está sujeto a escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas encontradas en el tejido, órgano o célula diana.

[0092] En algunas realizaciones, Y es hidrolizable in vivo. En estas realizaciones, Y comprende un grupo funcional que es capaz de sufrir hidrólisis in vivo. Los ejemplos no limitantes de grupos funcionales que son capaces de sufrir hidrólisis in vivo incluyen ésteres, anhídridos y tioésteres. En algunas realizaciones, el espaciador es metaestable in vivo. En estas realizaciones, el espaciador comprende un grupo funcional que es capaz de escindirse química o enzimáticamente in vivo (por ejemplo, un grupo funcional lábil en ácido, lábil a la reducción o lábil a la enzima), opcionalmente durante un período de tiempo. Por ejemplo, Y se puede seleccionar para que sea estable en el suero sanguíneo durante al menos 10, 20, 25, 30, 60, 90 o 120 minutos, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 o 24 horas. En estas realizaciones, Y puede comprender, por ejemplo, un resto hidrazona, un resto disulfuro o un resto escindible con catepsina. Cuando Y es metaestable, y sin pretender ceñirse a ninguna teoría en particular, el conjugado WYZ es estable en un entorno extracelular, por ejemplo, estable en suero sanguíneo durante los períodos de tiempo descritos anteriormente, pero lábil en el entorno intracelular o condiciones que imitan la ambiente intracelular, de modo que se escinde al entrar en una célula. En algunas realizaciones cuando Y es metaestable, Y es estable en suero sanguíneo durante al menos aproximadamente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 42 o 48 horas, o alrededor de 24-48, 48-72, 24-60, 36-48, 36-72 o 48-72 horas.

[0093] De acuerdo con una forma de realización espaciador Y es una cadena lineal de 6 a 8 átomos que comprende un disulfuro, tioéter, selenoéter, diselenio, tioéster sulfóxido, oxima, hidrazona, triazol, alquilo, o un enlace alqueno dentro de la columna vertebral del espaciador cadena lineal. De acuerdo con una realización, el espaciador Y es una cadena lineal de 6 a 8 átomos que comprende un enlace disulfuro, tioéter, selenoéter, diselenio u oxima dentro del esqueleto de la cadena lineal espaciadora. De acuerdo con una realización, el espaciador Y es una cadena lineal de 6 a 8 átomos que comprende un enlace disulfuro, tioéter, selenoéter o diselenio dentro del esqueleto de la cadena lineal espaciadora. De acuerdo con una realización, el espaciador tiene la estructura general:



- 15 donde R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y alquilo C₁-C₃; Y es C, S, Se u S=O,
 Z es C, S, Se, -S (C₁-C₃) (arilo C₅-C₆) -, o Z en combinación con Y es-C-, -O -, -N-, o un 1,2,3 triazol
 n es 0 o 1; y
 m es 1, 2 o 3, en el que cuando Y es O, Z es C. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que Y es C, S, o Se y Z es C, S, o Se, o Z en combinación con Y es -O- o un 1,2,3 triazol, con la condición de que Y y Z no sean ambos C. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que Y es C, O, o Se y Z es C, o Z en combinación con Y es -O- o un triazol 1, 2, 3. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que Y es S o Se y Z es C, S o Se, o Z en combinación con Y es -O- o un triazol 1, 2, 3. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que Z en combinación con Y es -O- o un triazol 1, 2, 3. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que Z en combinación con Y forma una oxima o una hidrazone. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH; Y es C, S o Se, Z es Se o S; n es 0 o 1; ym es 1, 2 o 3. En una realización, el espaciador tiene la estructura general de fórmula I en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH; Y y Z se seleccionan independientemente de S y Se; n es 0 o 1; ym es 1, 2 o 3.
- 20
- 25
- 30 [0094] De acuerdo con una realización, el espaciador tiene la estructura general de Fórmula I en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, y C₁-C₂ alquilo, Y es S o O, Z es Co S, n es 0 o 1; ym es 1, 2 o 3, con la condición de que cuando Y es O, Z es C. De acuerdo con una realización, el espaciador tiene la estructura general de Fórmula I en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 son independientemente seleccionado del grupo que consiste en H y CH₃, Y es S, Z es Co S, n es 0 o 1; ym es 1, 2 o 3. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II:
- 35

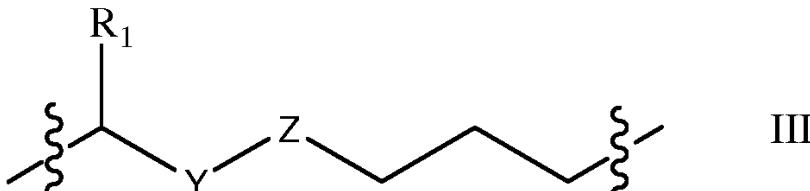


- 50 en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y C₁-C₂ alquilo, n es 0 o 1, ym es 1, 2 o 3. En una realización, la porción $(CH_2)_n CR_1 R_2 S$ del espaciador representa la cadena lateral de un aminoácido C-terminal de la incretina, y en una realización (donde n es 0 y R_1 y R_2 son cada uno H) el aminoácido C-terminal es cisteína. Además, en una realización, la porción $-SCR_1 R_2 (CH_2)_m$ del espaciador representa una derivación tiol del extremo N-terminal, o cadena lateral de aminoácidos, de la cadena B de la insulina. La formación del enlace disulfuro une la insulina derivatizada a la incretina para formar una increlina.
- 55
- 60 [0095] En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, y CH₃, n es 0 ó 1, y m es 1, 2 o 3. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de la Fórmula II en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 0 y m es 1, 2 o 3. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II en la que R_2 y R_3 son ambos H, R_1 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 0 o 1, ym es 1, 2 o 3. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de la Fórmula II en la que R_2 , R_3 y R_4 son cada uno H, R_1 es H o CH₃, n es 0 o 1, ym es 1 o 2. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II en la que R_3 y R_4 son
- 65

cada uno H, R₁ y R₂ son independientemente H o CH₃, n es 0 y m es 2. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II en la que R₂, R₃ y R₄ son cada uno H, R₁ es H o CH₃, n es 0 y m es 2. En una realización R₁, R₂, R₃ y R₄ son cada uno H, n es 0 y m es 1, 2 o 3.

- 5 [0096] En una realización, el espaciador comprende la estructura general de la Fórmula III:

10



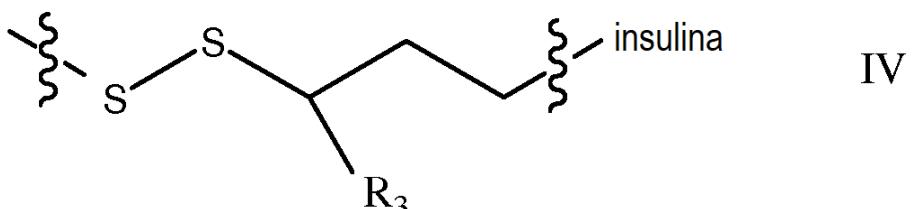
15

en la que R₁ es H o CH₃, Y es S, Se o S=O, Z es C, Se o S, en la que cuando Y es S=O, Z es C. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula III, en la que R₁ es H o CH₃, Y es S y Z es S. En una realización, el conjugado de incretina-insulina comprende la estructura:

20

25

incretina-cisteína



30

en la que R₃ es H o CH₃.

35

[0097] En una realización la incretina-insulina conjugado comprende un enlace covalente del extremo carboxi terminal de un péptido de incretina al extremo amino o carboxi de la cadena A de insulina o de la cadena B a través de un espaciador de la fórmula general de I, II, III o IV. En otra realización, el extremo N-terminal o C-terminal de un péptido de insulina está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido de un péptido de incretina en una posición seleccionada entre 10, 20, 24, 28 y 29, opcionalmente en la posición B29, mediante un espaciador de Fórmula I, II, III o IV.

40

[0098] En otra realización uno o dos incretina péptidos están unidos covalentemente al péptido insulina a través de una posición seleccionada independientemente de la alfa amina N-terminal de la cadena B, el extremo carboxi terminal de la cadena B o en cualquier posición del resto de unión que une la cadena A y la cadena B de un análogo de insulina monocatenario, incluido, por ejemplo, en la posición C8. En una realización, la región carboxi terminal del péptido de incretina está unida covalentemente a la alfa amina N-terminal de la cadena B de un péptido de insulina. En una realización, el extremo carboxi del péptido de incretina está unido covalentemente a la amina alfa N-terminal de la cadena B de un análogo del péptido de insulina de cadena simple o de dos cadenas.

50

[0099] De acuerdo con una realización, el péptido de insulina es una insulina de dos cadenas, donde la cadena A y la cadena B están vinculados entre sí mediante enlaces disulfuro. En una realización, el conjugado comprende un péptido de insulina de dos cadenas en el que la región carboxi terminal del péptido de incretina está unida covalentemente al extremo amino de la cadena A del péptido de insulina. En una realización, el conjugado comprende un péptido de insulina de dos cadenas en el que el extremo carboxi de la cadena A o la cadena B del péptido de insulina está unido covalentemente al extremo amino del péptido de incretina. En una realización, el conjugado comprende un péptido de insulina de dos cadenas en el que el extremo carboxi del péptido de incretina está unido covalentemente a la amina N-terminal de la cadena B del péptido de insulina. En una realización, el conjugado comprende un péptido de insulina de dos cadenas en el que el extremo carboxi de la cadena B del péptido de insulina está unido covalentemente al extremo amino del péptido de incretina. En cada una de estas realizaciones, el enlace entre el péptido de incretina y el péptido insulina se realiza mediante un espaciador de Fórmula general I, II, III o IV, en el que cuando se utiliza el enlazador IV, el péptido de incretina comprende una cisteína C-terminal.

65 [0100] En otra realización, el conjugado comprende una cadena doble análogo de insulina y un primer y segundo

péptido de incretina en donde cada péptido de incretina está independientemente unido covalentemente al péptido de insulina en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en el extremo amino terminal de la cadena B, el extremo carboxi de la cadena A y el extremo carboxi de la cadena B. En una realización, el conjugado comprende un péptido de insulina de dos cadenas en el que la región carboxi terminal de un primer péptido de incretina está unida covalentemente al extremo amino de la cadena B del péptido de insulina y el extremo carboxi de la cadena B del péptido de insulina está covalentemente ligado al extremo amino de un segundo péptido de incretina. En una realización, los péptidos incretinas primero y segundo son diferentes y tienen actividad en dos receptores diferentes seleccionados del grupo que consiste en los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP. En una realización, el primer péptido de incretina tiene actividad en el receptor de glucagón y el segundo péptido de incretina tiene actividad en el receptor GLP-1. En una realización, el primer y/o segundo péptido de incretina es un coagonista que tiene actividad en dos receptores seleccionados del grupo que consiste en receptores de glucagón, GLP-1 y GIP. En cada una de estas realizaciones, el enlace entre el péptido de incretina y el péptido de insulina se realiza mediante un espaciador de Fórmula general I, II, III o IV.

5 [0101] En algunas o cualquiera de las realizaciones, el péptido de insulina del conjugado descrito actualmente es insulina natural, que comprende la cadena A de SEQ ID NO: 1 y la cadena B de la SEQ ID NO: 2, o un análogo de la insulina nativa, incluyendo por ejemplo, un análogo de insulina monocatenario que comprende las SEQ ID NOS: 1 y 2. En una realización, el péptido de insulina es un péptido análogo de IGF^{B16B17}. De acuerdo con la presente divulgación, los análogos de insulina abarcan polipéptidos que comprenden una cadena A y una cadena B en los que los análogos de insulina se diferencian de la insulina nativa en una, dos o tres o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones seleccionadas entre A5, A8, A9, A10., A12, A14, A15, A17, A18, A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B17, B20, B21, B22, B23, B26, B27, B28, B29 y B30 o eliminaciones de cualquiera o todas las posiciones B1-4 y B26-30.

10 15 [0102] En una realización, el componente peptídico incretina del conjugado es un péptido seleccionado del grupo que consiste en glucagón nativo (SEQ ID NO: 701), GLP-1 nativo (SEQ ID NO: 703) y GIP nativo (SEQ ID NO : 707). En una realización, el péptido de incretina comprende una extensión C-terminal que comprende la secuencia GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820), KRNRNNIA (SEQ ID NO: 821) o KRNRS (SEQ ID NO: 822) unida al aminoácido carboxi terminal de la péptido de incretina. En una realización, la extensión del terminal Ces GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820). En una realización adicional, el péptido de incretina comprende un ácido aminoisobutírico en la posición 2, una extensión C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820) y una alquilación o acilación opcional en la posición 10 y/o 40 con un alquilo C₁₀ a C₂₀ o grupo acilo y, opcionalmente, pegilación adicional en la cadena lateral de un aminoácido añadido (por ejemplo, en la posición 40, con respecto a la secuencia de glucagón nativa) al extremo C-terminal del péptido de incretina. En una realización, el péptido de incretina está pegilado en la cadena lateral de los aminoácidos en ambas posiciones 24 y 40. En una realización, el péptido de incretina es un péptido glucagón o péptido GLP-1. En una realización, el péptido de incretina es un péptido seleccionado del grupo que consiste en Y (aib) EGTFTSDYSIYLDKQAA (aib) EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 756), H (aib) QGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWLAPGPS-amida (19) SEQ ID NO: 756) (aib) EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1932),

20 25 HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMTGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1933), y YaVibSiDif. : 756, 1931, 1932, 1933 o 1934 por 1, 2 o tres sustituciones o adiciones de aminoácidos, incluyendo por ejemplo una sustitución en la posición 10, opcionalmente con lisina, y/o la adición de un aminoácido en la posición 40, opcionalmente lisina. En una realización adicional, la lisina en la posición 10 y/o 40 se acila y/o el aminoácido añadido en la posición 40 se pegila. En una realización, el péptido de incretina es un péptido seleccionado del grupo que consiste en Y (aib) EGTFTSDYSIYLDKQAA (aib) EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 756), H (aib) QGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWLAPGPS-amida: 19 H (aib) EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1932). En una realización, el péptido de incretina es Y (aib) EGTFTSDYSIYLDKQAA (aib) EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 756), o H (aib) QGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWLAPGPS-amida (31) SEQ ID NO: 756). En una realización, el péptido de incretina es Y (aib) EGTFTSDYSIYLDKQAA (aib) EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 756), o un péptido que difiere de SEQ ID NO: 756 en 1, 2 o tres sustituciones o adiciones de aminoácidos, incluyendo por ejemplo, sustituciones en la posición 10, opcionalmente con lisina, y/o la adición de un aminoácido en la posición 40. En una realización adicional, la lisina en la posición 10 se acila y/o el aminoácido añadido en la posición 40 se pegila. En una realización, el péptido de incretina es H (aib) QGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWLMTGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1931), o un péptido que difiere de SEQ ID NO: 1931 en 1, 2 o tres sustituciones o adiciones de aminoácidos, incluyendo por ejemplo sustituciones en la posición 10, opcionalmente con lisina, y/o la adición de un aminoácido en la posición 40. En una realización adicional, la lisina en la posición 10 se acila y/o el aminoácido añadido en la posición 40 se pegila.

30 35 40 45 50 55 60 65 [0103] En algunas realizaciones, el péptido de incretina del conjugado de la presente divulgación es un análogo de glucagón humano nativo (SEQ ID NO: 701) que comprende una secuencia de aminoácidos basado en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 701 pero que difieren de SEQ ID NO: 701 por uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 y, en algunos casos, 16 o más (por ejemplo, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, etc.), modificaciones de aminoácidos optionales o especificadas. En algunas o en cualquiera de las realizaciones, el péptido de las presentes descripciones comprende un total de 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7,

5 hasta 8, hasta 9 o hasta 10 modificaciones de aminoácidos adicionales (p. ej., además del aminoácido especificado modificaciones ácidas), en relación con la secuencia de glucagón humano nativo (SEQ ID NO: 701). Por ejemplo, en una realización, un análogo de glucagón (SEQ ID NO: 701) comprende (a) un aminoácido que comprende una cadena lateral de imidazol en la posición 1, (b) un aminoácido protector de DPP-IV en la posición 2, (c) un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado en cualquiera de las posiciones 9, 10, 12, 16, 20 o 37-43, (d) un aminoácido estabilizador de hélice alfa en una o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20 y 21, y e) hasta diez modificaciones de aminoácidos adicionales con respecto a la SEQ ID NO: 701. En una realización, la presente divulgación proporciona un análogo de glucagón que comprende (a) - (d) con hasta a 10 modificaciones de aminoácidos adicionales además de las modificaciones de aminoácidos especificadas en (a) - (d). En algunas o 10 cualesquieras realizaciones, las modificaciones son cualquiera de las descritas en el presente documento, por ejemplo, acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en el extremo C-terminal, sustitución del aminoácido en una o más de las posiciones 1, 2, 3, 7, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29.

[0104] De acuerdo con una forma de realización una insulina agonista/incretina conjugado está provisto que comprende un péptido de incretina y un péptido de insulina, donde el péptido de incretina está vinculada a la insulina péptido a través de un lineal cadena espaciadora de 5 a 10 átomos, donde el espaciador comprende un enlace disulfuro, tioéter, tioéter sulfóxido, alquilo, alqueno dentro del esqueleto de la cadena lineal espaciadora. En una realización, la región C-terminal del péptido de incretina se une covalentemente al péptido de insulina a través de una posición seleccionada independientemente de la cadena lateral de un aminoácido en la posición B3, B28 o B29.

20 una posición seleccionada independientemente de la cadena lateral de un aminoácido en la posición B5, B20 o B23
de la cadena B y la alfa amina N-terminal. de la cadena B. En una realización, el péptido de insulina del conjugado
comprende una secuencia de cadena A de GIVEQCCX₈ SICSLYQLENYC₂₁ (SEQ ID NO: 3), o un análogo del
mismo que tiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre A5, A9, A10, A12., A14,
A15, A17, A18, y una secuencia de cadena B de R₂₂ -HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅ (SEQ ID NO: 15), o un
análogo del mismo que tiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre B5, B9, B10,
B13, B14, B17, B20, B21, B22 y B23 (posiciones relativas a la insulina nativa) donde la cadena B está unida a la
cadena A a través de enlaces disulfuro; y

R₂₂ es una amina, o una secuencia de 1 a 4 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un FVNQ (SEQ ID NO: 12), FVKQ (SEQ ID NO: 8), VNQ, NQ y Q;

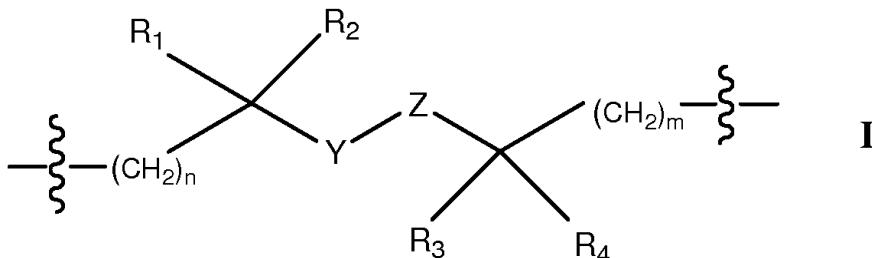
X₈ se selecciona del grupo que consiste en treonina e histidina;

30 X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en asparagina, lisina, glicina, alanina; y

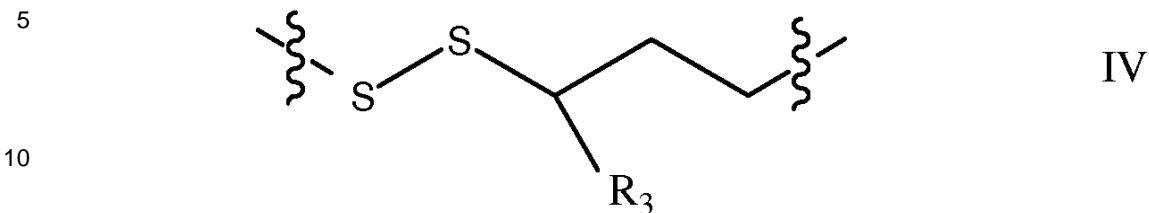
X₄₅ es histidina, tirosina o fenilalanina. En una realización, la insulina se une a la incretina a través de un espaciador de Fórmula general I (como se define en el presente documento), en donde el péptido de incretina comprende la secuencia X₈₀ X₈₁ X₈₂ GTFTSDX₉₅ SX₈₃ YLX₈₄ X₈₅ X₈₆ X₈₇ AX₈₈ X₈₉ FX₉₀ X₉₁ WLX₉₂ X₉₃ X₉₄ -Z (SEQ ID NO: 1928), donde X₈₀ es His, Tyr, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina o alfa, ácido alfa-dimetil imidazol acético (DMIA) N-metil histidina, alfa-metil histidina o ácido imidazol acético:

55 alfa-dimetil imidazol acetico (DMIA) N-metil histidina, alfa-metil histidina o acido imidazol acetico,
 X₈₁ es Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina, ácido aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina o D-alanina; X₈₂
 es Gln o Glu; X₈₃ es Lys o Ile; X₈₄ es Asp o Glu; X₈₅ es Lys, Arg, Ser o Glu; X₈₆ es Arg o Gln; X₈₇ es Ala o Arg; X₈₈ es
 Aib, Gln o Lys; X₈₉ es Asp o Glu; X₉₀ es Val o Ile; X₉₁ es Asn, Gln o Ala; X₉₂ es Leu, Val o Met; X₉₃ es Asp, Lys Asn o
 Ala; X₉₄ es Gly o Thr; y Z se selecciona del grupo que consiste en-COOH,-CONH₂ y GPSSGAPPPS-CONH₂ (SEQ
 40 ID NO: 823) y X₉₅ es Tyr. En una realización, X₈₀ es His o Tyr y X₈₆ es aib.

[0105] En una realización, se proporciona un conjugado de incretina-insulina en el que el aminoácido C-terminal de los péptidos de incretina está unido covalentemente a la insulina péptido a través de un lineal spacer cadena en una posición seleccionada independientemente de la cadena lateral de un aminoácido en posición B3, B28 o B29 de la cadena B, y la amina alfa N-terminal de la cadena B. En una realización, el aminoácido C-terminal de los péptidos de incretina se une covalentemente al péptido de insulina mediante un espaciador de cadena lineal en la alfa-amino N-terminal de la cadena B. De acuerdo con una realización, el péptido de insulina comprende una secuencia de cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de cadena B de FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFYTPKT (SEQ ID NO: 2), o una cadena A y/o cadena B que difiere de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en 1, 2 o tres sustituciones de aminoácidos, en las que la cadena B está unida a la cadena A a través de enlaces disulfuro; un espaciador de cadena lineal que comprende la estructura general de Fórmula II:



en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 0 o 1, m es 1, 2 o 3, Y es S, Se o Cy Z es S o Se; o un enlazador de Fórmula IV:



15 en la que R₃ es H o CH₃; y el péptido de incretina comprende la secuencia X₈₀ X₈₁ X₈₂ GTFTSDX₇₉ SX₈₃ YLX₈₄ X₈₅ X₈₆ X₈₇ AX₈₈ X₈₉ FX₉₀ X₉₁ WLX₉₂ X₉₃ X₉₄ -Z₁ (SEQ ID NO: 1928), en donde

X₇₉ es un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo C12 a C18;

X₈₀ es His, Tyr, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina o ácido alfa, alfa-dimetilimidiazol acético (DMIA) N-metil histidina, alfa-metil histidina o ácido imidazol acético;

20 X₈₁ es Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina o ácido aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina y D-alanina; X₈₂ es Gln o Glu;

X₈₃ es Lys o Ile;

X₈₄ es Asp o Glu;

X₈₅ es Lys, Arg, Ser o Glu;

25 X₈₆ es Arg o Gln;

X₈₇ es Ala o Arg;

X₈₈ es ácido aminoisobutírico, Gln o Lys;

X₈₉ es Asp o Glu;

X₉₀ es Val o Ile;

30 X₉₁ es Asn, Gln o Ala;

X₉₂ es Leu, Val o Met;

X₉₃ es Asp, Lys Asn o Ala;

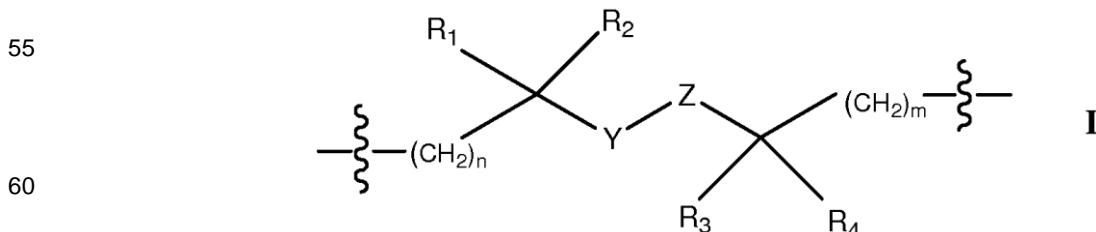
X₉₄ es Gly o Thr;

35 X₉₅ es un enlace o Gly, y Z₁ se selecciona del grupo que consiste en-COOH, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820), KRNRRNNIA (SEQ ID NO: 821) y KNRN(SEQ ID NO: 822). En una realización, el péptido de incretina comprende la secuencia X₈₀ X₈₁ X₈₂ GTFTSDX₇₉ SX₈₃ YLX₈₄ X₈₅ X₈₆ X₈₇ AX₈₈ X₈₉ FX₉₀ X₉₁ WLX₉₂ X₉₃ X₉₄ -Z₁ (SEQ ID NO: 1928), en donde

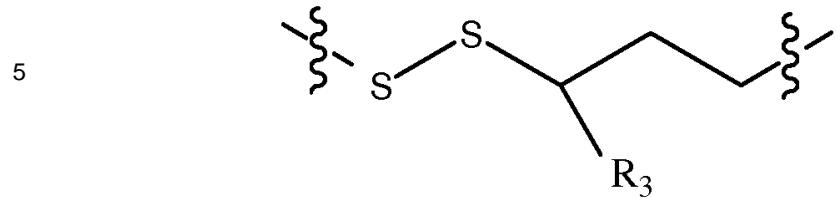
X₇₉ es un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo C12 a C18, opcionalmente lisina o; X₈₀ es His o Tyr, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina o ácido alfa, alfa-dimetilimidiazol acético (DMIA) N-metil histidina, alfa-metil histidina o ácido imidazol acético; X₈₁ es D-serina o ácido aminoisobutírico (AIB); X₈₂ es Gln o Glu; X₈₃ es Lys o Ile; X₈₄ es Asp o Glu; X₈₅ es Lys, Arg, Ser o Glu; X₈₆ es Arg o Gln; X₈₇ es Ala o Arg; X₈₈ es ácido aminoisobutírico, Gln o Lys; X₈₉ es Asp o Glu; X₉₀ es Val o Ile; X₉₁ es Asn, Gln o Ala; X₉₂ es Leu, Val o Met; X₉₃ es Ala, Asp, Lys Asn o Ala; X₉₄ es Gly o Thr; y Z₁ se selecciona entre el grupo que

40 consiste en-COOH, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820), KRNRRNNIA (SEQ ID NO: 821), y KNRN(SEQ ID NO: 822). En una realización Z₁ es la SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS).

[0106] De acuerdo con una realización, el péptido de insulina comprende una secuencia de la cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de la cadena B de FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), o una cadena A y/o Cadena B que difiere de SEQ ID NO: 1 y/o SEQ ID NO: 2 en 1, 2 o tres sustituciones de aminoácidos, en la que la cadena B está unida a la cadena A a través de enlaces disulfuro; un espaciador de cadena lineal que comprende la estructura general de Fórmula II:



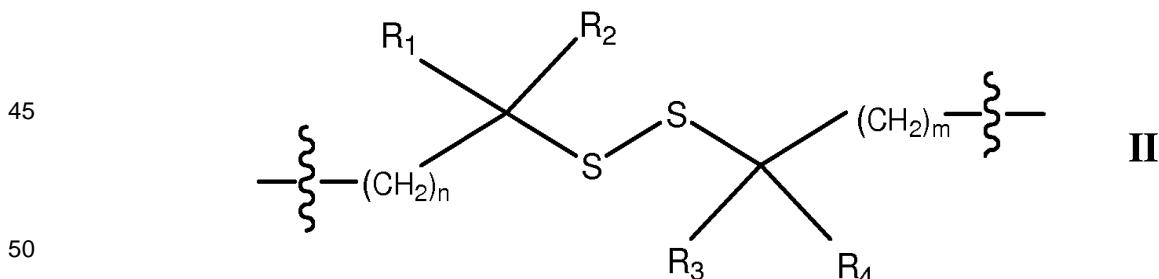
65 En la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 0 o 1, m es 1, 2 o 3, Y es S, Se o Cy Z es S o Se; o un enlazador de Fórmula IV:



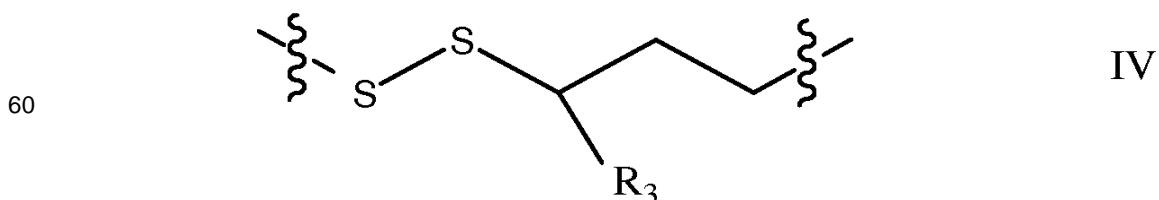
en la que R₃ es H o CH₃; y
el péptido de incretina comprende la secuencia X₈₀ X₈₁ X₈₂ GTFTSDX₇₉ SKYLX₈₄ X₈₅ X₈₆ AAX₈₈ X₈₉ FVQWLX₉₀ X₉₁
X₉₂ X₉₃ X₉₄ GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1929)

- 15 donde:
- X₇₉ es un amino ácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo C12 a C18;
X₈₀ es Tyr, His, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homohistidina o ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina o imidazol acético ácido;
X₈₁ es un aminoácido protector de DPP-IV, opcionalmente, un aminoácido alfa, alfa disustituido (por ejemplo, AIB);
20 X₈₂ se selecciona del grupo que consiste en Glu, Ala, Leu, Ile, Nle, Val, NorVal, homoserina, Met, sulfóxido de metionina, metionina sulfona, acetil-Orn, ácido acetil-diaminobutanoico y acetil-Lys;
X₈₄ es un aminoácido ácido, opcionalmente Glu o Asp;
X₈₅ es Glu, Ala, alfa, aminoácido alfa disustituido (por ejemplo, AIB), His, Lys.
X₈₆ es Arg, His o Gln;
- 25 X₈₈ es un grupo seleccionado del grupo que consiste en: aminoácido alfa, alfa disustituido (por ejemplo, AIB) o Gln o His, Lys o Ala;
X₈₉ es un aminoácido ácido, opcionalmente Asp o Glu;
X₉₀ es Leu, Ala o Nle;
- 30 X₉₁ es Ala, Lys o un aminoácido ácido (opcionalmente, Asp o Glu);
X₉₂ es alifático, por ejemplo, Ala o Gly o AIB o Val;
X₉₃ es un aminoácido alifático pequeño, por ejemplo, Ala o Gly
X₉₄ es Ala o un aminoácido básico (opcionalmente, Arg o Lys).

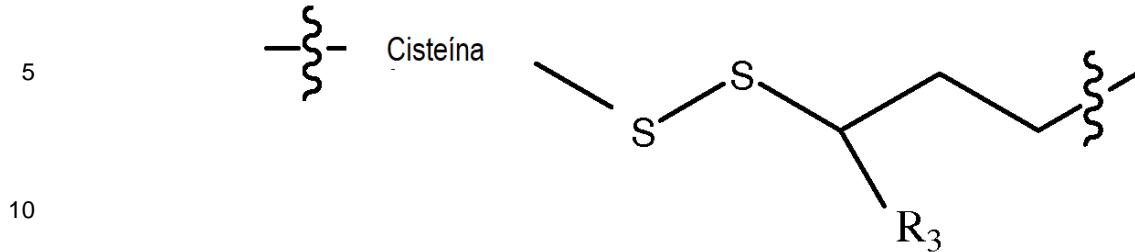
35 [0107] En una realización adicional, el péptido de incretina es un péptido seleccionado del grupo que consiste en Y (aib) EGTFTSDYSIYLDKQAA (aib) EFVNWLLAGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 756), H (aib) QGTFTSDYSKYLDERAQPGF-VPSSWide: 1931), H (aib) EGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIawlVKGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1932), HSQGTFTSDYSKYLDSRRA Q DFVQWLMNTGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1933aGPSSGAPPPS-amida), y opcionalmente a secuencias anteriores, modificadas para comprender un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo C12 a C18 en la posición 10 o 40; y el espaciador que une la incretina al péptido de insulina comprende la estructura general de Fórmula II:



en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, y alquilo C₁-C₂, n es 0 o 1, y m es 1, 2 o 3. En una realización, el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 1 y m es 2. En una realización, el enlazador comprende la estructura de Fórmula IV:

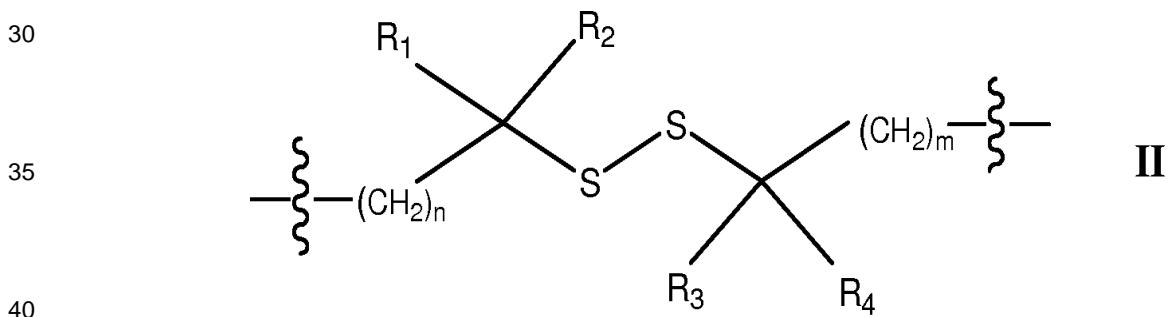


en la que R_3 es H o CH_3 y opcionalmente R_3 es H. En una realización, el enlazador consiste en la estructura de

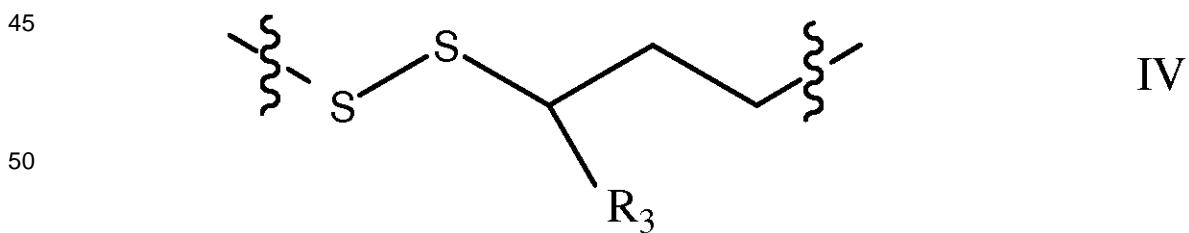


[0108] En una realización, el péptido de insulina de la insulina agonista/incretina conjugado comprende una secuencia de una cadena de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de la cadena B seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2) FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9) FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (SEQ ID NO: 5) FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (SEQ ID NO: 6).

[0109] En una realización adicional una insulina agonista/incretina conjugado está provisto que comprende la XYZ estructura general en la que Xes un péptido de incretina que tiene la secuencia X₁ X₂ EGTFTSDX₁₀ SIYLDKQAX₂₀ EFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2037), X₁ X₂ EGTFTSDVSIYLDKQAX₂₀ EFVNWLLAGGPSSGAPPPSX₄₀ (SEQ ID NO: 2038), y (AIB) EGTFTSDYSIYLDKQAA (AIB) EFVNWLLAGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 756), o H (AIB) QGTFTSDYSKYLDERAAQDFVQWLLDGGPSSGAPPPS-amida (SEQ ID NO: 1931), en el que X₁ es suyo o Tyr; X₂ es ácido aminoisobutírico; X₁₀ es Lys acilado con un grupo alquilo C16 a C20 opcionalmente mediante un enlazador gamma Glu; X₂₀ es ácido aminoisobutírico; y X₄₀ es Lys acilado con un grupo alquilo C16 a C20 opcionalmente mediante un enlazador gamma Glu; Xes el espaciador que une la incretina al péptido de insulina y que comprende la estructura general de Fórmula II:



en la que R_1 , R_2 , R_3 y R_4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, y CH₃, n es 0 o 1, y m es 1, 2 o 3; o el espaciador comprende la estructura general de Fórmula IV:



en la que R₃ es H o CH₃, y opcionalmente R₃ es H; y Z es un péptido de insulina que comprende una secuencia de cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de cadena B seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2) FVNQHLCGSHLVEALYLVCG (SEQ ID NO: 1) FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (SEQ ID NO: 5) FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (SEQ ID NO: 6).

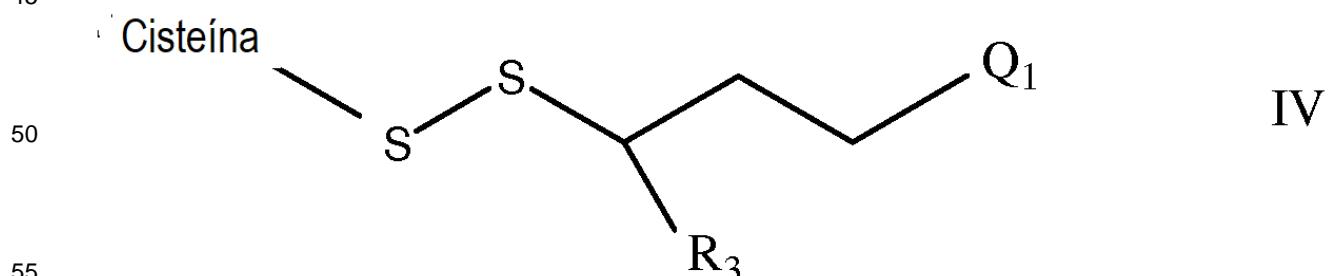
[0110] De acuerdo con una forma de realización está lipidada el conjugado incretina-insulina (por ejemplo, la adición de un acilo no nativo o un grupo alquilo) o pegilado (adición de cadena de polietilenglicol) en la cadena lateral de un aminoácido de dicho conjugado. En una realización, la lipideación se produce en una posición seleccionada entre las posiciones 10, 16, 20, 30 o 40 del péptido de incretina (donde las posiciones 30 y 40 representan extensiones C-terminales añadidas al péptido de incretina en relación con la secuencia nativa de glucagón) y/o en las posiciones B28 o B29 del péptido de insulina. En una realización, dos sitios seleccionados de las posiciones 10, 16, 20, 30 o 40

del péptido de incretina y las posiciones B28 o B29 del péptido de insulina están lipidados. En una realización, uno o dos sitios seleccionados de las posiciones 10, 16, 20, 30 o 40 del péptido de incretina están lipidados. En una realización, uno o dos sitios seleccionados de las posiciones 10 y 40 del péptido de incretina están lipidados, opcionalmente con un grupo acilo en una o dos de esas posiciones. En una realización, el péptido de incretina se acila en la posición 10 con un grupo acilo C14-C18. En una realización, el péptido de incretina comprende un grupo alquilo o acilo no nativo de C14 a C30 o C14 a C20, o C16 a C20, unido covalentemente a una cadena lateral en la posición 10 o 40 del péptido de incretina (basado en la numeración de glucagón nativo). En una realización, un grupo acilo o alquilo C12, C, 13, C14, C15, C16, C17, C18, C19 o C20 está unido a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 10 o 40, opcionalmente a través de un enlazador tal como ácido gamma glutámico.

[0111] En una realización, el conjugado incretina-insulina está PEGilado en una posición seleccionada de las posiciones 24, 30 o 40 del péptido de la incretina (en los que las posiciones 30 y 40 representan extensiones C-terminales añadidos al péptido de incretina relación a la secuencia de glucagón nativo) y/o en las posiciones B28 o B29 del péptido de insulina. En una realización, se pegilan dos sitios seleccionados de las posiciones 24, 30 o 40 del péptido de incretina y las posiciones B28 o B29 del péptido de insulina. En una realización, se pegilan dos sitios seleccionados de las posiciones 24, 30 o 40 del péptido de incretina. En una realización, el conjugado de incretina-insulina se pegila en las posiciones 24 y 40 del péptido de incretina. En una realización, el conjugado de incretina-insulina se pegila solo en la posición 40 del péptido de incretina.

[0112] En una realización, el conjugado incretina-insulina comprende tanto lipidación y pegilación, en donde el conjugado incretina-insulina está lipidada en una posición seleccionada de 10, 16, 20, 30 o 40 del péptido de incretina o B28 posición o B29 de la péptido de insulina y pegilado en una posición seleccionada entre 24, 30 o 40 del péptido de incretina o la posición B28 o B29 del péptido de insulina, siempre que la pegilación y lipidación ocurran en diferentes posiciones. En una realización, el conjugado de incretina-insulina comprende tanto lipidación como pegilación, en donde el conjugado de incretina-insulina está lipidado en la posición 10 y pegilado en la posición 40.

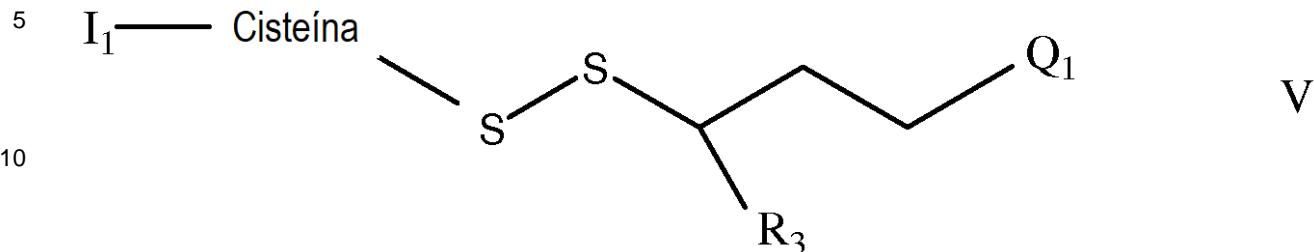
[0113] En una realización, se proporciona un conjugado de incretina-insulina que comprende un péptido de incretina seleccionado del grupo que consiste de X₁ X₂ EGTFTSDX₁₀ SIYLDKQAAAX₂₀ EFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2037) y X₁ X₂ EGTFSDVSIYLDKQAAAX₂₀ FVNWLLAGGPSSGAPPSX₄₀ (SEQ ID NO: 2038), donde X₁ es His o Tyr; X₂ es ácido aminoisobutírico; X₁₀ es Lys acilado con un grupo alquilo C16 a C20 opcionalmente mediante un enlazador gamma Glu; X₂₀ es ácido aminoisobutírico; y X₄₀ es Lys acilado con un grupo alquilo C16 a C20 opcionalmente mediante un enlazador gamma Glu; un péptido de insulina que comprende una secuencia de cadena A de GIVEQC₈ SICSLYQLEN₂₁ (SEQ ID NO: 3); y una secuencia de la cadena B de R₂₂ -HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅ (SEQ ID NO: 15), en la que la cadena B está unida a la cadena A a través de enlaces disulfuro; y R₂₂ es un enlace, o una secuencia de 1 a 4 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un FVNQ (SEQ ID NO: 12), FVKQ (SEQ ID NO: 8), VNQ, NQ y Q; X₈ se selecciona del grupo que consiste en treonina e histidina; X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en asparagina, lisina, glicina, alanina; y X₄₅ es histidina, tirosina o fenilalanina; y un espaciador de cadena lineal que une la incretina al péptido de insulina, en el que el espaciador comprende la estructura general de



en la que el aminoácido cisteína del espaciador de cadena lineal está unido al terminal carboxi de la incretina a través de un enlace amida y Q₁ es el N-termino de la cadena B de la insulina. En una realización adicional, el péptido de insulina comprende una secuencia de cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLEN₁₃ (SEQ ID NO: 1); y una secuencia de la cadena B seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9), FVNQHLCGSHLVEALYLVD¹CGVEALY () y FVNQHLCGSHLVEALYLVD¹CGVEALY (SEQG) En una realización, el componente de insulina es una insulina de

dos cadenas.

[0114] En una realización la incretina comprende la estructura general de



En la que I₁ es una incretina seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1987, 1993, 2014, y 2015, unido a través de su extremo carboxilo terminal a la cisteína de fórmula V a través de una enlace amida y Q₁ es un péptido de insulina unido a través del terminal N de la cadena B, en el que la cadena A comprende una secuencia de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1); y la cadena B comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9), FVNQHLCGSHLQVEALYLVKKGFF: () y SEQ ID NO: 9 una increlina que difiere de las SEQ ID NO: 1987, 1993, 2014 y 2015 por 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y/o una cadena A de insulina que difiere de la SEQ ID NO: 1 por 1 o 2 sustituciones de aminoácidos y/o una cadena B de insulina que difiere de la SEQ ID NO: 2 en 1 o 2 sustituciones de aminoácidos.

Péptidos de insulina

[0115] El componente de péptido de insulina de los conjugados de la presente descripción puede comprender la B nativo y la cadena de secuencias A de la insulina humana (SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente) o cualquiera de los análogos o derivados conocidos de los mismos que agonista exposición insulina actividad cuando se vinculan entre sí en un heterodúplex. Dichos análogos incluyen, por ejemplo, proteínas que tienen una cadena A y una cadena B que se diferencian de la cadena A y la cadena B de la insulina humana por tener una o más delecciones de aminoácidos, una o más sustituciones de aminoácidos y/o una o más inserciones de aminoácidos que no destruyen la actividad de la insulina del análogo de insulina. El componente de péptido de insulina del conjugado puede incluir, por ejemplo, cualquier péptido de insulina descrito en las solicitudes internacionales publicadas WO96/34882, WO 2010/080607, WO 2010/080609, WO 2011/159882, WO/2011/159895 y Patente de EE.UU. 6.630.348.

[0116] En una realización, el péptido de insulina es un análogo de insulina en la que:

(a) el residuo de aminoácido en la posición B28 está sustituido con Asp, Lys, Leu, Val o Ala, y el residuo de aminoácido en la posición B29 es Lys o Pro;

(b) los residuos de aminoácidos en cualquiera de las posiciones B27, B28, B29 y B30 están suprimidos o sustituidos con un aminoácido no nativo. En una realización, se proporciona un análogo de insulina que comprende una Asp sustituida en la posición B28 o una Lys sustituida en la posición 28 y una prolina sustituida en la posición B29. Se describen análogos de insulina adicionales en Chance, et al., Patente de EE.UU. Nº 5.514.646; Chance, et al., Solicitud de patente de EE.UU. Nº 08/255.297; Brems y col., Protein Engineering, 5: 527-533 (1992); Brange y col., Publicación EPO nº 214.826 (publicada el 18 de marzo de 1987); y Brange y col., Current Opinion in Structural Biology, 1: 934-940 (1991).

[0117] Los análogos de insulina también pueden tener sustituciones de la amidado amino ácidos con formas ácidas. Por ejemplo, Asn se puede reemplazar con Asp o Glu. Asimismo, Gln se puede reemplazar con Asp o Glu. En particular, Asn (A18), Asn (A21) o Asp (B3), o cualquier combinación de esos residuos, pueden reemplazarse por Asp o Glu. Además, Gln (A15) o Gln (B4), o ambos, pueden reemplazarse por Asp o Glu.

[0118] Tal como se describe se proporcionan agonistas de la presente memoria individuales de insulina de cadena que comprende una cadena B y una cadena A de la insulina humana, o análogos o derivado del mismo, en el que el extremo carboxilo terminal de la cadena B está ligado al extremo amino terminal de la cadena A a través de una unión de la mitad. En una realización, la cadena A es una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en GIVEQCCTSICSLYQLENYCN (SEQ ID NO: 1), GIVDECCFRSCDLRRLEMYCA (SEQ ID NO: 68) o GIVEECCFRSCDLALLETYCA (SEQ ID NO: 70) y la cadena B comprende la secuencia FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), GPETLCGAELVDALYLVCGDRGFYFNKPT (SEQ ID NO: 69) o AYRPSETLCGGELVDTLYLVCGDRGFYFSRPA (SEQ ID NO: B26 aminoácidos que tienen una secuencia de carboxi B26 acortada a uno), o B a 29 correspondiente a su secuencia eliminadas, y análogos de aquellas secuencias en las que cada secuencia se modifica para comprender de una a cinco sustituciones de aminoácidos en las posiciones correspondientes a las posiciones de la insulina nativa (ver alineación de péptidos que se muestra en la Fig.1) seleccionada de A5, A8, A9, A10, A14, A15, A17, A18, A21, B1, B2, B3, B4, B5, B9, B10, B13, B14, B20,

B22, B23, B26, B27, B28, B29 y B30. En una realización, las sustituciones de aminoácidos son sustituciones de aminoácidos conservativas. Los expertos en la técnica conocen las sustituciones de aminoácidos adecuadas en estas posiciones que no impactan negativamente en las actividades deseadas de la insulina, como se demuestra, por ejemplo, en Mayer, et al., Insulin Structure and Function, Biopolymers. 2007; 88 (5): 687-713. Pueden añadirse secuencias de aminoácidos adicionales al extremo amino de la cadena B o al extremo carboxi de la cadena A de los agonistas de insulina de cadena única como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede añadir una serie de aminoácidos cargados negativamente al extremo amino terminal de la cadena B, incluyendo, por ejemplo, un péptido de 1 a 12, 1 a 10, 1 a 8 o 1 a 6 aminoácidos de longitud y que comprende un o aminoácidos cargados más negativamente que incluyen, por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico. En una realización, la extensión amino terminal de la cadena B comprende de 1 a 6 aminoácidos cargados. De acuerdo con una realización, los conjugados de incretina-insulina descritos en el presente documento comprenden una amida o éster C-terminal en lugar de un carboxilato C-terminal en la cadena A.

[0119] de alta potencia conjugados incretina-insulina también pueden prepararse basa en utilizar una secuencia de IGF I e IGF II modificado descrito en la solicitud internacional publicada no. WO 2010/080607 como componente de péptido de insulina. Más particularmente, los análogos de IGF I e IGF II que comprenden una sustitución de un dipéptido de tirosina leucina por los aminoácidos de IGF nativo en las posiciones correspondientes a B16 y B17 de la insulina nativa tienen un aumento de diez veces en la potencia en el receptor de insulina.

[0120] De acuerdo con una realización, el péptido de insulina para su uso en la presente divulgación comprende una secuencia de la cadena B de R₂₂ -X₂₅ LCGX₂₉ X₃₀ LVX₃₃ X₃₄ LYLVCGX₄₁ X₄₂ GFX₄₅ (SEQ ID NO: 20) y una secuencia de cadena A de GIVX₄ X₅ CCX₈ X₉ X₁₀ CX₁₂ LX₁₄ X₁₅ LX₁₇ X₁₈ YCX₂₁ -R₄₄ (SEQ ID NO: 19) donde X₄ es ácido glutámico o ácido aspártico; X₅ es glutamina o ácido glutámico. X₈ es histidina, treonina o fenilalanina; X₉ es serina, arginina, lisina, ornitina, o alanina; X₁₀ es isoleucina o serina; X₁₂ es serina o ácido aspártico. X₁₄ es tirosina, arginina, lisina, ornitina o alanina; X₁₅ es glutamina, ácido glutámico, arginina, alanina, lisina, ornitina o leucina; X₁₇ es glutamina, ácido glutámico, arginina, ácido aspártico o lisina, ornitina X₁₈ es metionina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico o treonina; X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina, serina, valina, treonina, isoleucina, leucina, glutamina, ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico, histidina, triptófano, tirosina y metionina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₉ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina y serina; X₃₀ se selecciona del grupo que consiste en histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico y ácido cisteico; X₃₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico, glutamina y ácido glutámico; X₃₄ se selecciona del grupo que consiste en alanina y treonina; X₄₁ se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico o asparagina; X₄₂ se selecciona del grupo que consiste en alanina, lisina, ornitina y arginina; X₄₅ es tirosina, histidina, asparagina o fenilalanina; R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en AYRPSE (SEQ ID NO: 14), FVNQ (SEQ ID NO: 12), PGPE (SEQ ID NO: 11), un tripéptido glicina-prolina-ácido glutámico, un tripéptido valina-asparagina -glutamina, un dipéptido prolina-ácido glutámico, un dipéptido asparagina-glutamina, glutamina, ácido glutámico y un enlace; y R₁₃ es COOH o CONH₂. En una realización, la cadena A y la cadena B están unidas entre sí mediante enlaces disulfuro, incluidos los que se forman entre las cadenas A y B de la insulina nativa. En una realización alternativa, las cadenas A y B están unidas entre sí como un péptido de insulina lineal de cadena única.

[0121] De acuerdo con una realización, se proporciona un análogo de insulina donde la cadena A de la péptido de insulina comprende la secuencia de GIVEQCCX₈ SICSLYQLENYCX₂₁ R₁₃ (SEQ ID NO: 3) o un análogo del mismo que tiene 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en una posición seleccionada entre A5, A9, A10, A12, A14, A15, A17, A18, y la cadena B que comprende la secuencia R₂₂ -X₂₅ LCGX₂₉ X₃₀ LVX₃₃ X₃₄ LYLVCGX₄₁ X₄₂ GFX₄₅ YT-Z 1 - B 1 (SEQ ID NO: 67), donde X₈ se selecciona del grupo que consiste en treonina e histidina; X₂₁ es asparagina o glicina; X₂₅ es histidina o treonina; X₂₉ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina y serina; X₃₀ se selecciona del grupo que consiste en histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico y ácido cisteico; X₃₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico; X₃₄ se selecciona del grupo que consiste en alanina y treonina; X₄₁ se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico o asparagina; X₄₂ se selecciona del grupo que consiste en alanina, ornitina, lisina y arginina;

X₄₅ es tirosina o fenilalanina;

R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en FVNQ (SEQ ID NO: 12), un tripéptido valina-asparagina-glutamina, un dipéptido asparagina-glutamina, glutamina y una amina N-terminal

Z₁ es un dipéptido seleccionado del grupo que consiste en aspartato-lisina, lisina-prolina y prolina-lisina; y

5 B₁ se selecciona entre el grupo que consiste en treonina, alanina o un tripeptíodo treonina-arginina-arginina.

Agonistas de péptidos de insulina de cadena única

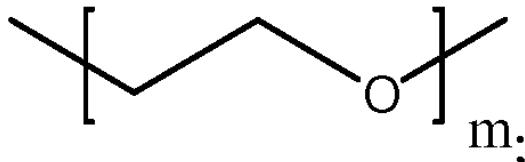
10 [0122] Tal como se describe en el presente documento restos de unión se puede usar para enlace Insulina humana cadenas A y B, o análogos o derivados de los mismos, en el que el extremo carboxi terminal de la B25 amino ácido de la cadena B está directamente vinculado a un primer extremo de un resto de unión, en el que el segundo extremo del resto de enlace está directamente unido al extremo amino del aminoácido A1 de la cadena A mediante el resto de enlace intermedio.

15 [0123] De acuerdo con una realización, el péptido de insulina es un agonista de la insulina de cadena única que comprende la estructura general B-LM-A en la que B representa una cadena de insulina B, A representa un cadena A de la insulina, y LM representa un resto de unión que une el terminal carboxi de la cadena B al terminal amino de la cadena A. Los restos de enlace adecuados para unir la cadena B a la cadena A se describen en el presente documento bajo el encabezado restos de enlace para análogos de insulina de cadena única y los respectivos

20 subtítulos "enlazadores peptídicos" y "enlazadores no peptídicos". En una realización, el resto de enlace comprende un péptido de enlace y, más particularmente, en una realización el péptido representa un análogo del péptido IGF-1C. Las posiciones de los aminoácidos del resto de enlace se designan basándose en la posición correspondiente en la cadena Cnativa de IGF 1 (SEQ ID NO: 17). En otra realización, el resto de enlace peptídico comprende una secuencia de 29 aminoácidos contiguos que tiene más del 70%, 80%, 90% de identidad de secuencia con SSSSX₅₀

25 APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁ (SEQ ID NO: 1924), en la que X₅₀ y X₅₁ se seleccionan independientemente de arginina y lisina. En una realización, el resto de enlace es un enlazador no peptídico que comprende un enlazador polimérico no peptídico bifuncional relativamente corto que se aproxima a la longitud de una secuencia de 8-16 aminoácidos. En una realización, el enlazador no peptídico tiene la estructura: en la que m es un número entero que varía de 10 a 14 y el resto enlazador está enlazado directamente al aminoácido B25 de la cadena B. De acuerdo con

30 una realización, el resto de enlace no peptídico es un enlazador de polietilenglicol de aproximadamente 4 a 20, 8 a 18, 8 a 16, 8 a 14, 8 a 12, 10 a 14, 10 a 12 o 11 a 13 monómeros.



35 40 [0124] En una realización, un conjugado de la incretina-insulina se proporciona que comprende un péptido de insulina que tiene la estructura: IB-LM-IA, en el que IB comprende la secuencia R₂₂-X₂₅LCGX₂₉X₃₀LVX₃₃X₃₄LYLVCGX₄₁X₄₂GFX₄₅ (SEQ ID NO: 20), LM es un resto de enlace como se describe en el presente documento que une covalentemente IB a IA, e IA comprende la secuencia GIVX₄X₅CCX₈X₉X₁₀CX₁₂LX₁₄X₁₅LX₁₇X₁₈YCX₂₁-R₄₄ (SEQ ID NO: 19), donde

45 X₄ es ácido glutámico o ácido aspártico;

X₅ es glutamina o ácido glutámico;

X₈ es histidina o fenilalanina;

X₉ se selecciona de arginina, lisina, ornitina, o alanina;

X₁₀ es isoleucina o serina;

50 X₁₂ es serina o ácido aspártico;

X₁₄ es tirosina, arginina, lisina, ornitina o alanina;

X₁₅ es arginina, lisina, ornitina o leucina;

X₁₇ es ácido glutámico o glutamina;

X₁₈ es metionina, asparagina o treonina;

55 X₂₁ es alanina, glicina o asparagina;

X₂₅ se selecciona del grupo que consiste en histidina y treonina;

X₂₉ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina y serina;

X₃₀ se selecciona del grupo que consiste en histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico y ácido cisteico;

60 X₃₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico;

X₃₄ se selecciona del grupo que consiste en alanina y treonina;

X₄₁ se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico o asparagina;

X₄₂ se selecciona del grupo que consiste en alanina, lisina, ornitina y arginina;

65 R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en AYRPSE (SEQ ID NO: 14), FVNQ (SEQ ID NO: 12), PGPE (SEQ ID NO: 11), un tripeptíodo glicina-prolina-ácido glutámico, un tripeptíodo valina-asparagina -glutamina, un dipéptido

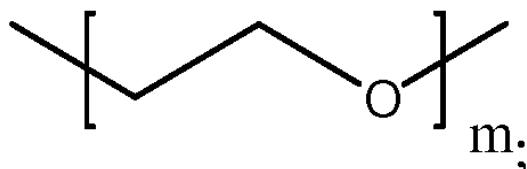
prolina-ácido glutámico, un dipéptido asparagina-glutamina, glutamina, ácido glutámico y una amina N-terminal; y R₁₃ es COOH o CONH₂, además en donde el aminoácido en la designación X₄₅ está directamente unido al resto de enlace, LM (es decir, la designación IB-LM-IA como se utiliza en este documento pretende representar que el carboxilo de la cadena B terminal y el terminal amino de la cadena A están directamente enlazados al resto de enlace LM sin más aminoácidos intermedios).

[0125] En una realización, el resto de enlace (LM) comprende una secuencia de aminoácidos de no más de 17 aminoácidos de longitud. En una realización, el resto de enlace comprende la secuencia GYGSSSRR(SEQ ID NO: 61), GYGSSSRRAPQT (SEQ ID NO: 23) o GAGSSSRRAPQT (SEQ ID NO: 64)

[0126] En otra realización, el resto de unión comprende una secuencia de 29 aminoácidos contiguos, directamente ligado a la aminoácido carboxi terminal de la cadena B, en el que dicha 29 secuencia de amino ácido contigua tiene más de 70%, 80%, 90% de identidad de secuencia a SSSSX₅₀ APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁ (SEQ ID NO: 1924), en el que X₅₀ y X₅₁ se seleccionan independientemente entre arginina y lisina. En una realización, el péptido de enlace comprende un total de 29 a 158 o de 29 a 58 aminoácidos y comprende la secuencia de SEQ ID NO: 68.

En otra realización, el resto de enlace comprende una secuencia de 29 aminoácidos contiguos, directamente enlazados al terminal carboxi aminoácido de la cadena B, en el que dicha secuencia de 29 aminoácidos contiguos tiene una identidad de secuencia superior al 90% con SSSSX₅₀ APPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQX₅₁ (SEQ ID NO: 1924), en el que X₅₀ y X₅₁ se seleccionan independientemente de arginina y lisina. En una realización, el resto de unión comprende la secuencia SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPK (SEQ ID NO: 1923) o SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR(SEQ ID NO: 1922) opcionalmente con una o dos sustituciones de aminoácidos.

[0127] De acuerdo con una realización, se proporciona un polipéptido agonista de insulina de cadena única que comprende una cadena B y A de la cadena de la insulina humana, o análogos o derivado del mismo, en el que la última de cinco carboxi amino ácidos de la cadena B nativa se eliminan (es decir, B26-B30) y el aminoácido B25 está unido al aminoácido A1 de la cadena A a través de un resto de enlace intermedio. En una realización, el resto de enlace comprende la estructura:



en la que m es un número entero que varía de 10 a 14 y el resto de enlace está enlazado directamente al aminoácido B25 de la cadena B.

[0128] En una realización, se proporciona un conjugado de incretina-insulina que comprende un péptido de insulina tiene la fórmula general IB-LM-IA en la que IB comprende la secuencia X₂₅ LCGX₂₉ X₃₀ LVX₃₃ X₃₄ LYLVCGX₄₁ X₄₂ GFX₄₅ (SEQ ID NO: 20); LM comprende la secuencia SSSSRAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQK (SEQ ID NO: 1923), SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR(SEQ ID NO: 1922), GYGSSSRR(SEQ ID NO: 61) o GAGSSSRR(SEQ ID NO: 1925); y IA comprende la secuencia GIVX₄ X₅ CCX₈ X₉ X₁₀ CX₁₂ LX₁₄ X₁₅ LX₁₇ X₁₈ YCX₂₁ - R₄₄ (SEQ ID NO: 19) donde

X₄ es ácido glutámico o ácido aspártico;

X₅ es glutamina o ácido glutámico;

X₈ es histidina, treonina o fenilalanina;

X₉ es serina, arginina, lisina, ornitina, o alanina;

X₁₀ es isoleucina o serina;

X₁₂ es serina o ácido aspártico;

X₁₄ es tirosina, arginina, lisina, ornitina o alanina;

X₁₅ es glutamina, ácido glutámico, arginina, alanina, lisina, ornitina o leucina;

X₁₇ es ácido glutámico, ácido aspártico, asparagina, lisina, ornitina o glutamina;

X₁₈ es metionina, asparagina, glutamina, ácido aspártico, ácido glutámico o treonina;

X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina, serina, valina, treonina, isoleucina, leucina, glutamina, ácido glutámico, asparagina, ácido aspártico, histidina, triptófano, tirosina y metionina;

X₂₅ es histidina o treonina;

X₂₉ se selecciona del grupo que consiste en alanina, glicina y serina;

X₃₀ se selecciona del grupo que consiste en histidina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido homocisteico y ácido cisteico;

X₃₃ se selecciona del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico;

X₃₄ se selecciona del grupo que consiste en alanina y treonina;

X₄₁ se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico o asparagina;

X₄₂ se selecciona del grupo que consiste en alanina, ornitina, lisina y arginina;

X₄₅ es tirosina o fenilalanina;

R₂₂ se selecciona del grupo que consiste en AYRPSE (SEQ ID NO: 14), FVNQ (SEQ ID NO: 12), FVKQ (SEQ ID NO: 8), PGPE (SEQ ID NO: 11), un tripéptido glicina-prolina -ácido glutámico, un tripéptido valina-asparagina-glutamina, un dipéptido prolina-ácido glutámico, un dipéptido asparagina-glutamina, glutamina, ácido glutámico y una amina N-terminal; y

5 R₄₄ es COOH o CONH₂

Glicosilación

10 [0129] Durante análogos nacientes in vivo de proteínas de insulina de producción que comprende sitios de glicosilación pueden someterse a un procesamiento adicional, conocido como modificación post-traduccional, en el que los residuos de azúcar (glicosil) se pueden añadir enzimáticamente en un proceso conocido como glicosilación. Las proteínas resultantes que llevan cadenas laterales de oligosacáridos unidas covalentemente se conocen como proteínas glicosiladas o glicoproteínas. Por consiguiente, una proteína que lleva un sitio de glicosilación no está necesariamente glicosilada.

15 De acuerdo con una realización, se proporcionan análogos de agonistas de insulina que se han modificado para comprender una secuencia peptídica que es propensa a la hiperglicosilación cuando se expresa en un sistema de expresión eucariota.

20 [0130] Las secuencias de glicosilación no nativos y nativas son conocidos por los expertos en la técnica e incluyen los sitios de glicosilación unidos a N, y O-ligados sitios de glicosilación. Los sitios de glicosilación unidos a N son secuencias de péptidos que sirven como sitios de reconocimiento para la unión enzimática de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de glicosilación unidas a tripéptido O incluyen asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde Xes cualquier aminoácido excepto prolina. Por tanto,

25 la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un sitio de glicosilación potencial. La glicosilación ligada a O son secuencias de péptidos que sirven como sitios de reconocimiento para la unión enzimática de un resto de carbohidrato a la cadena lateral de un hidroxiaminoácido, más comúnmente serina o treonina, aunque también se pueden usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. En una realización, el azúcar de glicosilación unido a O es N-aceilgalactosamina, galactosa o xilosa. Se conocen en la técnica varios sitios de glicosilación unidos a O y se han informado en la bibliografía. Véase, por ejemplo, Ten Hagen et al. (11029) J. Biol. Chem. 274 (39): 27867-74; Hanisch y col. (2001) Glycobiology 11: 731-740; y Ten Hagen et al. (2003) Glycobiology 13: 1R-16R.

30 [0131] De acuerdo con una realización se proporciona un procedimiento de producción de un análogo de insulina hiperglicosilada. El procedimiento comprende proporcionar una célula huésped eucariota que comprende un gen que codifica un análogo de insulina que ha sido modificado para incluir un sitio de glicosilación no nativo (por ejemplo, una secuencia de péptido CTP) y cultivar la célula en condiciones que permitan la expresión del gen del análogo de insulina.. En una realización, la célula huésped expresa enzimas de glicosilación humana de manera que las proteínas glicosiladas (glicoproteínas) producidas en la célula huésped exhiben una glicosilación de proteínas idéntica a la de las células humanas (véanse las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. Nos. 2004/0018590 y 2002/0137134). De acuerdo con una realización, la célula huésped eucariota se selecciona de células de levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*) o de mamífero (CHO o HEK293).

35 [0132] En una realización, un sitio de glicosilación se introduce por la adición de aminoácidos secuencias de ácido al análogo de insulina base. Más particularmente, los solicitantes han descubierto que la secuencia peptídica denominada péptido C-terminal (CTP: SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQR; SEQ ID NO: 1922), que es propensa a la hiperglicosilación ligada a O cuando la proteína se expresa en un sistema de expresión celular eucariota puede unirse covalentemente a un análogo de insulina sin socavar la actividad inherente in vitro del análogo de insulina.

40 [0133] De acuerdo con una realización, se proporciona un análogo de insulina que comprende A una cadena B de la cadena y y un péptido CTP, en donde el péptido CTP está un péptido que tiene al menos 60, 70, 80, 85, 90, o 95% de identidad de secuencia con (SEQ ID NO: 1922). En una realización, el péptido CTP es un péptido que comprende una secuencia de 18 a 29 aminoácidos que comparte al menos 80, 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96 o 98% de identidad de secuencia con una región de 18 a 29 aminoácidos de (SEQ ID NO: 1922). En una realización, el péptido CTP comprende un análogo de (SEQ ID NO: 1922), en el que dicho análogo difiere de (SEQ ID NO: 1922) en 1, 1 a 2, 3 a 4, 4 a 6 o hasta 8 sustituciones de aminoácidos. En una realización, la sustitución de aminoácidos está en una o más posiciones seleccionadas de 1-4, 7-15, 18, 20, 21, 24 y 27 de (SEQ ID NO: 1922). En una realización, la sustitución de aminoácidos está en una o más posiciones seleccionadas entre 1, 2, 3, 4, 10, 13, 15 y 21 de (SEQ ID NO: 1922). En una realización, la sustitución de aminoácidos está en una o más posiciones seleccionadas entre 7, 8, 9, 12, 14, 18, 20, 24 y 27 de (SEQ ID NO: 1922). En una realización, el péptido CTP comprende una secuencia de 29 aminoácidos que difiere de la SEQ ID NO: 1922 en 1 a 2 sustituciones de aminoácidos. En una realización adicional, el péptido CTP comprende un fragmento de SEQ ID NO: 1922 en el que el fragmento representa una secuencia de aminoácidos contigua de 18 a 28 idéntica a una secuencia de aminoácidos contenida en SEQ ID NO: 1922.

Pegilación de péptidos de insulina

[0134] Los solicitantes han descubierto que la unión covalente de un resto hidrófilo al péptido o incretina del conjugado incretina-insulina da a conocer en el presente documento proporcionan análogos que tienen más lento inicio, duración prolongada y exhiben un perfil basal de actividad. En una realización, los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento se modifican adicionalmente para comprender un resto hidrófilo unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en 24, 30 o 40 del péptido de incretina, y/o posición A9, A14 y A15 de la cadena A, en la amina alfa N-terminal de la cadena B o en la cadena lateral de un aminoácido en la posición B1, B2, B3, B10, B22, B28 o B29 de la B cadena o en cualquier posición del resto de enlace que une la cadena A y la cadena B en un análogo de cadena simple de insulina, o cualquier combinación de los mismos. En realizaciones exemplares, este resto hidrófilo está unido covalentemente a un resto Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetiflenilalanina en cualquiera de estas posiciones. En una realización, el péptido de insulina es un análogo de cadena única y el resto hidrófilo está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido del resto de enlace que une las cadenas A y B.

[0135] Los restos hidrófilos ejemplares incluyen polietilenglicol (PEG), por ejemplo, de un peso molecular de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton, o de aproximadamente 20.000 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton. Otros restos hidrófilos adecuados incluyen polipropilenglicol, polioles polioxietilados (p. Ej., POG), sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), polioxialquilenos, polietilenglicol propionaldehído, copolímeros de etilenglicol, polietilenglicol, monometoxietilenglicol, polietilenglicol, monopolietilenglicol, (Cl-CIO) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli (beta-aminoácidos) (homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propopilenglicol (PPG) y otros óxidos de poliaquíleno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, ácidos colónicos u otros polímeros polisacáridos, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos.

[0136] El resto hidrófilo, por ejemplo, cadena de polietilenglicol de acuerdo con algunas realizaciones tiene un peso molecular seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En una realización, el resto hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Dalton, o de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton. En otra realización, el resto hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Dalton. En otra realización ejemplar más, el resto hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Dalton. En una realización, el resto hidrófilo, por ejemplo, PEG, tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Dalton. En una realización, se proporciona un péptido de insulina en el que uno o más aminoácidos del análogo están pegilados y el peso molecular combinado de las cadenas de PEG unidas covalentemente es de aproximadamente 20.000 Dalton.

[0137] En una forma de realización dextranos se utilizan como el resto hidrófilo. Los dextranos son polímeros polisacáridos de subunidades de glucosa, predominantemente unidos por enlaces α 1-6. El dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, por ejemplo, aproximadamente 1 kD a aproximadamente 100 kD, o de aproximadamente 5, 10, 15 o 20 kD a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 kD.

[0138] polímeros lineales o ramificados se contemplan. Las preparaciones resultantes de conjugados pueden ser esencialmente monodispersas o polidispersas, y pueden tener aproximadamente 0,5, 0,7, 1, 1,2, 1,5 o 2 restos poliméricos por péptido.

[0139] En una realización, el resto hidrófilo es un polietilenglicol de cadena (PEG), vinculada a la cadena lateral de un aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo que consiste en 24, 30 o 40 del péptido de incretina, y/o por lo la cadena lateral de un aminoácido en la posición B28 o B29 de la cadena B o en cualquier posición del resto de enlace que une la cadena A y la cadena B en un análogo de cadena simple de insulina, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el conjugado de incretina-insulina se pegila en uno, dos o más aminoácidos en una posición seleccionada del grupo que consiste en 24, 30 o 40 del péptido de incretina, o en la cadena lateral de un aminoácido en la posición B1, B2, B3, B10, B22, B28 o B29 de la cadena B o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el peso molecular total de la (s) cadena (s) de PEG unidas covalentemente es de aproximadamente 20.000 Dalton.

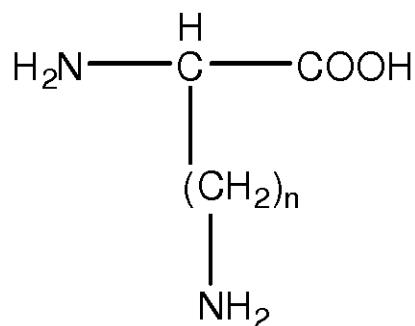
[0140] Los restos hidrófilos tales como polietilenglicol se pueden unir al conjugado incretina-insulina bajo cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Se puede usar cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo vía acilación, alquilación reductora, adición de Michael, alquilación de tiol u otros procedimientos de conjugación/ligación quimoselectiva a través de un grupo reactivo en el resto de PEG (por ejemplo, un aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino) a un grupo reactivo en el compuesto objetivo (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazino). Los grupos activadores que pueden usarse para unir el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen, sin limitación, sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano y 5-piridilo. Si se une al péptido

mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un solo aldehído reactivo de modo que se controle el grado de polimerización. Véase, por ejemplo, Kinstler et al., *Adv. Droga. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts y col., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002); y Zalipsky y col., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995).

Acilación

[0141] En algunas realizaciones, el péptido de insulina o de incretina del conjugado incretina-insulina se modifica para comprender un grupo acilo. El grupo acilo se puede unir covalentemente directamente a un aminoácido del conjugado incretina-insulina, o indirectamente a un aminoácido del conjugado incretina-insulina mediante un espaciador, donde el espaciador se coloca entre el aminoácido del conjugado incretina-insulina y el grupo acilo. El conjugado de incretina-insulina puede acilarse en la misma posición de aminoácido en la que se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Por ejemplo, la acilación puede ocurrir en cualquier posición incluyendo cualquiera de las posiciones 10, 16, 30 o 40 del péptido de incretina o cualquier aminoácido de las cadenas A o B, así como una posición dentro del resto de enlace, siempre que la actividad exhibida por el conjugado de insulina-incretina no acilado se retiene tras la acilación. Los ejemplos no limitantes incluyen acilación en las posiciones A14 y A15 de la cadena A, o las posiciones B1, B10, B22, B28 o B29 de la cadena B o en cualquier posición del resto de enlace. Otros ejemplos no limitantes incluyen acilación en las posiciones 10, 16 y 20, así como 30 o 40 para péptidos incretinos extendidos C-terminales.

[0142] De acuerdo con una realización, la incretina del conjugado incretina-insulina comprende una sustitución del aminoácido nativo Tyr en la posición 10 con un aminoácido de Fórmula Ia:



en la que $n = 1$ a 4, que comprende una cadena lateral unida covalentemente a un grupo acilo o un grupo alquilo. En una realización, n es 4.

[0143] En un aspecto específico de la divulgación, el análogo de insulina se modifica para comprender un grupo acilo, por acilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del conjugado incretina-insulina. En algunas realizaciones, el análogo de insulina se acila directamente a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones, la acilación está en la posición B28 o B29 (según la numeración de aminoácidos de las secuencias de las cadenas A y B de la insulina nativa). En este sentido, se puede proporcionar un análogo de insulina que haya sido modificado por una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de la cadena A o B, incluyendo por ejemplo en las posiciones A14, A15, B1, B2, B10, B22, B28 o B29 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de las secuencias de las cadenas A y B de la insulina nativa) o en cualquier posición del resto de enlace con un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral. En algunas realizaciones específicas de la divulgación, la acilación directa del péptido de insulina ocurre a través de la amina de cadena lateral, hidroxilo o tiol del aminoácido en la posición B28 o B29 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos de las secuencias de cadena A y B de la insulina nativa).

[0144] De acuerdo con una realización, los análogos de insulina acilados comprenden un espaciador entre el péptido y el grupo acilo. En algunas realizaciones, el conjugado de incretina-insulina se une covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo acilo. En algunas realizaciones ejemplares, el péptido de insulina se modifica para comprender un grupo acilo por acilación de una amina, hidroxilo o tiol de un espaciador, espaciador que está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición B28 o B29 (según la numeración de aminoácidos de la cadena A o B de la insulina nativa), o en cualquier posición del resto espaciador. El aminoácido del conjugado de incretina-insulina al que está unido el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprenda un resto que permita la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende una cadena lateral -NH₂, -OH, o-COOH (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado.

[0145] En algunas realizaciones, el espaciador entre el conjugado incretina-insulina y el grupo acilo es un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, hidroxilo o tiol (o un dipéptido o tripéptido que comprende

un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, hidroxilo o tiol). En algunas realizaciones, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli (alquiloxi) carboxilato. A este respecto, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_m\text{COOH}$, donde m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible comercialmente en Peptides International, Inc. (Louisville, KY). En una realización, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol y un grupo carboxilo o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras 10 realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato.

[0146] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido, el conjugado de incretina-insulina y el grupo acilo es un espaciador bifuncional hidrófobo. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, GT Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996). De acuerdo con ciertas 15 realizaciones, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o natural que comprende una cadena principal de aminoácidos que tiene de 3 a 10 átomos de longitud (p. Ej., Ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y Ácido 8-aminoctanoico). Alternativamente, el espaciador puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, de 6 a 10 átomos) de longitud. Cada aminoácido del espaciador dipéptido o tripéptido unido al conjugado de 20 incretina-insulina puede seleccionarse independientemente del grupo que consiste en: aminoácidos naturales y/o no naturales, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los D o L isómeros de los aminoácidos naturales (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr) o cualquier Isómero D o L de los aminoácidos no naturales seleccionados del grupo que consiste en: β -alanina (β -Ala), N- α -metil-alanina (Me-Ala), 25 ácido aminobutírico (Abu), α -aminobutírico ácido (γ -Abu), ácido amino hexanoico (ϵ -Ahx), ácido aminoisobutírico (Aib), ácido aminometilpirrol carboxílico, ácido aminopiperidinacarboxílico, aminoserina (Ams), ácido aminotetrahidropiran-4-carboxílico, arginina N-metoxi-N-metil amida ácido β -aspártico (β -Asp), ácido azetidina carboxílico, 3- (2-benzotiazolil) alanina, α -terc-butilglicina, ácido 2-amino-5-ureido-n-valérico (citrulina, Cit), β -ciclohexilala nueve (Cha), acetamidometilcisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilanalanina (DOPA), dimetiltiazolidina (DMTA), ácido γ -glutámico (γ -Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina 30 (Hyp), isoleucina N-metoxi-N-metilamida, metil-isoleucina (Melle), ácido isonipecótico (Isn), metil-leucina (MeLeu), metil-lisina, dimetil-lisina, trimetil-lisina, metanoprolina, metionina-sulfóxido (Met (O)), metionina-sulfona (Met (O2)), norleucina (Nle), metil-norleucina (Me-Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), ácido para-aminobenzoico (PABA), penicilamina (Pen), metilfenilalanina (MePhe), 4-clorofenilalanina (Phe (4-Cl)), 4-fluorofenilalanina (Phe (4-F)), 4-nitrofenilalanina (Phe (4-NO2)), 4-cianofenilalanina ((Phe (4-CN)), fenilglicina (Phg), piperidinilanina, 35 piperidinilglicina, 3,4-dehidroprolina, pirrolidinilanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), U-bencil-fososerina, 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico ácido (Sta), 4-amino-5-ciclohexil-3-hidr ácido oxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4, -tetrahidro-isoquinolin-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilanalanina (Thi), U-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O- (bis-dimetilamino-fosfono) -tirosina, sulfato de tirosina tetrabutilamina, metil-valina (MeVal), ácido 1-amino-1-ciclohexano 40 carboxílico (Acx), ácido amino valérico, beta-ciclopiprol-alanina (Cpa), propargilglicina (Prg), alilglicina (Alg), ácido 2-amino-2-ciclohexil-propanoico (2-Cha), tercbutilglicina (Tbg), vinilglicina (Vg), 1- ácido amino-1-ciclopropanocarboxílico (Acp), ácido 1-amino-1-ciclopentano carboxílico (Acpe), ácido 3-mercaptopropiónico alquilado, ácido 1-amino-1-ciclobutano carboxílico (Acb). En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido se 45 selecciona del grupo que consiste en: Ala-Ala, β -Ala- β -Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido γ -aminobutírico-ácido γ -aminobutírico y γ -Glu- γ -Glu.

[0147] El péptido del conjugado incretina-insulina puede ser modificada para comprender un grupo acilo, por acilación de una larga cadena de alcano de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbono. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es 50 un alcano de C₄ a C₃₀. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un alcano C₄, alcano C₆, alcano C₈, alcano C₁₀, alcano C₁₂, alcano C₁₄, alcano C₁₆, alcano C₁₈, alcano C₂₀, alcano C₂₂ alcano, alcano C₂₄, alcano C₂₆, alcano C₂₈ o un alcano C₃₀. En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C₈ a C₂₀, por ejemplo, un alcano C₁₄, un alcano C₁₆ o un alcano C₁₈.

[0148] En algunas realizaciones, una amina, hidroxilo o tiol grupo del conjugado incretina-insulina se acila con un ácido colesterol. En una realización específica, el péptido se une al ácido colesterol a través de un espaciador de Cys des-amino alquilado, es decir, un espaciador de ácido 3-mercaptopropiónico alquilado. Se conocen en la técnica procedimientos adecuados de acilación de péptidos mediante aminas, hidroxilos y tioles. Véase, por ejemplo, Miller, Biochem Biophys Res Commun 218: 377-382 (1996); Shimohigashi y Stammer, Int J Pept Protein Res 19: 54-62 (1982); y Previero et al., Biochim Biophys Acta 263: 7-13 (1972) (para procedimientos de acilación a través de un hidroxilo); y San y Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (para procedimientos de acilación a través de un tiol); Biocoujugate Chem. "Modificaciones químicas de proteínas: historia y aplicaciones" páginas 1, 2-12 (1990); Hashimoto y col., Pharmacuetical Res. "Síntesis de derivados de palmitoil de la insulina y su actividad biológica" Vol. 6, No: 2 págs. 171-176 (1989).

[0149] El grupo acilo de la acilado péptido conjugado incretina-insulina pueden ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cualquier cadena de carbono de longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones específicas de la divulgación, el grupo acilo es un ácido graso C₄ a C₃₀. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de una C₄ ácido graso, C₆ ácido graso, C₈ de ácidos grasos, C₁₀ ácido graso, C₁₂ ácido graso, C₁₄ ácido graso, C₁₆ ácido graso, C₁₈ ácido graso, Ácido graso C₂₀, ácido graso C₂₂, ácido graso C₂₄, ácido graso C₂₆, ácido graso C₂₈ o un ácido graso C₃₀. En algunas realizaciones, el grupo acilo es un ácido graso C₈ a C₂₀, por ejemplo, un ácido graso C₁₄ o un ácido graso C₁₆.

[0150] En una realización alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico y ácido colesterol.

Alquilación

[0151] En algunas realizaciones, el conjugado incretina-insulina se modifica para comprender un grupo alquilo. El grupo alquilo se puede unir covalentemente directamente a un aminoácido del péptido de insulina o al péptido de incretina, o indirectamente a un aminoácido del conjugado de incretina-insulina mediante un espaciador, donde el espaciador se coloca entre el aminoácido de la incretina, conjugado de insulina y el grupo alquilo. El grupo alquilo puede unirse al conjugado de incretina-insulina mediante un enlace éter, tioéter o amino. Por ejemplo, el conjugado de incretina-insulina puede alquilarse en la misma posición de aminoácido en la que se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente.

[0152] La alquilación se puede llevar a cabo en cualquier posición dentro del conjugado de incretina-insulina, incluyendo, por ejemplo, en la posición 10, 16, 30 o 40 del péptido de incretina o en la región C-terminal de la cadena B o en una posición en el resto de enlace, siempre que se mantenga la actividad de la insulina. En un aspecto específico de la divulgación, el conjugado de incretina-insulina se modifica para comprender un grupo alquilo por alquilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del conjugado de incretina-insulina. En algunas realizaciones, el conjugado de incretina-insulina se alquila directamente a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones específicas de la divulgación, la alquilación directa del conjugado de incretina-insulina ocurre a través de la amina de cadena lateral, hidroxilo o tiol del aminoácido en la posición A14, A15, B1 (para cadenas B basadas en insulina), B2 (para Cadena B basadas en IGF-1), B10, B22, B28 o B29 (según la numeración de aminoácidos de las cadenas A y B de la insulina nativa). Los ejemplos no limitantes incluyen la alquilación en las posiciones A14 y A15 de la cadena A, o las posiciones B1, B10, B22, B28 o B29 de la cadena B o en cualquier posición del resto de enlace. Los ejemplos adicionales no limitantes incluyen la alquilación en las posiciones 10, 16 y 20, así como 30 o 40 para péptidos incretinos extendidos C-terminales.

[0153] En algunas realizaciones de la descripción, el conjugado incretina-insulina comprende un espaciador entre el péptido y el grupo alquilo. En algunas realizaciones, el conjugado de incretina-insulina se une covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo alquilo. En algunas realizaciones exemplares, el conjugado de incretina-insulina se modifica para que comprenda un grupo alquilo mediante la alquilación de una amina, hidroxilo o tiol del conjugado, donde el espaciador está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición A14, A15, B1 (para cadenas B basadas en insulina), B2 (para cadenas B basadas en IGF-1), B10, B22, B28 o B29 (según la numeración de aminoácidos de las cadenas A y B de la insulina nativa) o en la posición 10, 16, 30 o 40 del péptido de incretina. El aminoácido del conjugado de incretina-insulina al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido (por ejemplo, un aminoácido sustituido en α individualmente o un aminoácido disustituido en α , α) que comprenda un resto que permita la unión al espaciador. Un aminoácido del conjugado incretina-insulina que comprende una cadena lateral -NH₂, -OH, o-COOH (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido, el conjugado incretina-insulina y el grupo alquilo es un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, hidroxilo o tiol o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, hidroxilo o tiol.

[0154] En el caso en el que la alfa amina se alquila, el aminoácido espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu. En realizaciones exemplares, el aminoácido espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalárico, ácido 7-aminoheptanoico., Ácido 8-aminoctanoico. Alternativamente, el aminoácido espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu, siempre que la alquilación se produzca en la alfa amina del residuo ácido. En el caso en el que se alquila la amina de cadena lateral del aminoácido espaciador, el aminoácido espaciador es un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula Ia (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible que tanto la amina alfa como la amina de cadena lateral del aminoácido espaciador estén alquiladas, de manera que el péptido esté dialquilado. Las realizaciones de la divulgación incluyen tales moléculas dialquiladas.

[0155] En algunas realizaciones, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización

específica, el espaciador comprende un amino poli (alquiloxi) carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, donde m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ejemplo, ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está disponible comercialmente en Peptides International, Inc. (Louisville, KY). En algunas realizaciones, el espaciador entre el

5 péptido, el conjugado de incretina-insulina y el grupo alquilo es un espaciador bifuncional hidrófilo. En determinadas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol y un grupo carboxilo o cualquier combinación de los mismos. En determinadas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende un grupo tiol y un carboxilato.

10 [0156] El espaciador (por ejemplo, amino ácido, dipéptido, tripéptido, el espaciador bifuncional hidrófilo, o espaciador bifuncional hidrófobo) es de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos de, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, el espaciador tiene aproximadamente 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud y el alquilo es un grupo alquilo C₁₂ a C₁₈, por ejemplo, grupo alquilo C₁₄, grupo alquilo C₁₆, de manera que la longitud total del espaciador y del grupo alquilo es de 14 a 28 átomos, por ejemplo, aproximadamente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 átomos. En algunas realizaciones, la longitud del espaciador y el alquilo es de 17 a 28 (por ejemplo, de 19 a 26, de 19 a 21) átomos.

20 [0157] De acuerdo con una realización, el espaciador bifuncional es un sintético o de origen no natural de aminoácidos que comprende una cadena principal de aminoácidos que es de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, 7- ácido aminoheptanoico y ácido 8-aminoctanoico). Alternativamente, el espaciador puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, de 6 a 10 átomos) de longitud. El dipéptido o tripéptido espaciador unido al conjugado de incretina-insulina puede estar compuesto de aminoácidos de origen natural y/o no natural, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos enseñados en este documento. En algunas realizaciones, el espaciador comprende una carga negativa total, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido se selecciona del grupo que consiste en: Ala-Ala, β-Ala-β-Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido γ-aminobutírico-ácido γ-aminobutírico y γ-Glu-γ -Glu. En una 30 realización, el espaciador dipéptido es γ-Glu- γ-Glu.

35 [0158] Los procedimientos adecuados de péptido de alquilación a través de aminas, hidroxilos, tioles y son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una síntesis de éter de Williamson para formar un enlace de éter entre el péptido de insulina y el grupo alquilo. Además, una reacción de sustitución nucleofílica del péptido con un haluro de alquilo puede dar como resultado cualquiera de un enlace éter, tioéter o amino. El grupo alquilo del péptido alquilado del conjugado de incretina-insulina puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cualquier longitud de cadena de carbono, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones de la divulgación, el grupo alquilo es un alquilo C₄ a C₃₀. Por ejemplo, el grupo alquilo puede ser cualquiera de una C₄ alquilo, C₆ alquilo, C₈ alquilo, C₁₀ alquilo, C₁₂ alquilo, C₁₄ alquilo, C₁₆ alquilo, C₁₈ alquilo, C₂₀ alquilo, C₂₂ alquilo, Alquilo C₂₄, alquilo C₂₆, alquilo C₂₈ o un alquilo C₃₀. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C₈ a C₂₀, por ejemplo, un alquilo C₁₄ o un alquilo C₁₆.

40 [0159] En algunas realizaciones específicas, el grupo alquilo comprende un resto esteroide de un ácido biliar, por ejemplo, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico, y el ácido colesterol.

45 [0160] Cuando un alcano de cadena larga se alquila por el conjugado incretina-insulina o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbono. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En ciertos aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano de C₄ a C₃₀. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de un alcano C₄, alcano C₆, alcano C₈, alcano C₁₀, alcano C₁₂, alcano C₁₄, alcano C₁₆, alcano C₁₈, alcano C₂₀, alcano C₂₂ alcano, alcano C₂₄, alcano C₂₆, alcano C₂₈ o un alcano C₃₀. En algunas realizaciones, el alcano de cadena larga comprende un alcano C₈ a C₂₀, por ejemplo, un alcano C₁₄, un alcano C₁₆ o un alcano C₁₈.

55 [0161] Además, en algunas realizaciones, la alquilación puede tener lugar entre el análogo de insulina y un resto de colesterol. Por ejemplo, el grupo hidroxilo del colesterol puede desplazar un grupo saliente en el alcano de cadena larga para formar un producto péptido de insulina-colesterol.

Formulaciones de liberación controlada

60 [0162] Como alternativa, los conjugados de la incretina-insulina descritas en este documento pueden ser modificados en una forma de depósito, de manera que la forma en que el conjugado de la presente descripción se libera en el cuerpo al que se administra es controlado con respecto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (ver, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos No. 4.450.150). Las formas de depósito de los conjugados de la presente divulgación pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende el conjugado de la presente

divulgación y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que el conjugado de la presente divulgación está encapsulado por o difundido por todo el material y/o degradación del material no poroso. A continuación, el depósito se implanta en la ubicación deseada dentro del cuerpo y el conjugado de la presente divulgación se libera del implante a una velocidad predeterminada.

5 [0163] Alternativamente, un polímero de depósito de gran tamaño puede estar vinculado a un elemento de dipéptido de auto-escisión que está enlazado covalentemente al conjugado como se describe en el presente documento. En esta realización, el polímero de depósito secuestra eficazmente el conjugado de incretina-insulina en su sitio de administración hasta que posteriormente se escinde del análogo de cadena única mediante una reacción no
10 enzimática a una velocidad predeterminada. Las formulaciones de depósito de análogos de insulina que utilizan un dipéptido autodescindible se han descrito en la solicitud internacional publicada núm. WO 2010/080607. En una realización, se proporciona un conjugado de incretina-insulina que comprende un elemento profármaco dipéptido en el que el elemento profármaco dipéptido está unido a un polímero grande tal como PEG o dextrano. En una realización, un elemento dipéptido autoescindible que comprende un polímero de depósito grande (que incluye, por ejemplo, PEG) se une a la cadena lateral de un aminoácido del resto de enlace, que incluye, por ejemplo, el aminoácido en la posición C8 del resto de enlace..

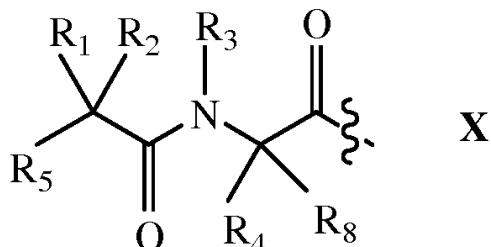
20 [0164] Las composiciones farmacéuticas se pueden preparar que comprenden los análogos de cadena única y están formulados para tener un efecto deseado *in vivo* perfil de liberación. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación de liberación inmediata, liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación retardada o liberación bifásica. Se conocen en la técnica procedimientos para formular péptidos o conjugados para liberación controlada. Véanse, por ejemplo, J Pharm 374: 46-52 (2009) y las publicaciones de solicitud de patente internacional Nos. WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; y WO 1999/040942. Las presentes composiciones pueden comprender además, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un efecto de almacenamiento y/o suministro prolongado. Las formulaciones farmacéuticas descritas se pueden administrar de acuerdo con cualquier régimen que incluye, por ejemplo, diariamente (1 vez al día, 2 veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día, 5 veces al día, 6 veces al día), cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, cada semana, cada dos semanas, cada tres semanas, cada mes o cada dos meses.

30 30 [0165] De acuerdo con una realización, el polímero de depósito se selecciona a partir de polímeros biocompatibles conocidos por los expertos en la técnica. Los polímeros de depósito tienen típicamente un tamaño seleccionado de un intervalo de aproximadamente 20.000 a 120.000 Dalton. En una realización, el polímero de depósito tiene un tamaño seleccionado de un intervalo de aproximadamente 40.000 a 100.000 o aproximadamente 40.000 a 80.000 Dalton. En una realización, el polímero de depósito tiene un tamaño de aproximadamente 40.000, 50.000, 60.000, 70.000 u 80.000 Dalton. Los polímeros de depósito adecuados incluyen, pero no se limitan a, dextranos, polilactidas, poliglicólicos, polímeros a base de caprolactona, poli (caprolactona), polianhídridos, poliaminas, poliesteramidas, poliortoésteres, polidioxanonas, poliacetales, policetales, policarbonatos, policarbonatos, polialtablateesfoestereso polifosfatos, succinatos, poli (ácido málico), poli (aminoácidos), polivinilpirrolidona, polietilenglicol, polihidroxicelulosa, polisacáridos, quitina, quitosano, ácido hialurónico y copolímeros, terpolímeros y mezclas de los mismos, y polímeros biodegradables y sus copolímeros, incluidos caprolacton polímeros, policaprolactonas y copolímeros que incluyen tereftalato de polibutileno. En una realización, el polímero de depósito se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, dextrano, ácido poliláctico, ácido poliglicólico y un copolímero de ácido láctico y ácido glicólico, y en una realización específica el polímero de depósito es polietilenglicol. En una realización, el polímero de depósito es polietilenglicol y el peso molecular combinado del polímero o los polímeros de depósito unidos al elemento dipéptido es de aproximadamente 40.000 a 80.000 Dalton.

50 [0166] De acuerdo con una forma de realización un elemento de dipéptido de auto-escisión se proporcionan, que comprende la estructura UJ, en el que U es un aminoácido o un ácido hidroxilo y j es un N-alquilados amino ácido. En una realización, uno o más elementos dipéptidos están unidos al conjugado de incretina-insulina a través de un enlace amida formado a través de uno o más grupos amino seleccionados del grupo amino N-terminal de la cadena B del componente de insulina, el N-terminal del componente peptídico incretina, o el grupo amino de la cadena lateral de un aminoácido presente en el conjugado. De acuerdo con una realización, uno o más elementos dipéptidos están unidos al conjugado de incretina-insulina en un grupo amino seleccionado del grupo amino N-terminal del conjugado, o el grupo amino de la cadena lateral de una amina aromática de un 4-amino- residuo de fenilalanina presente en una posición correspondiente a la posición A19, B16 o B25 de la insulina nativa, o una cadena lateral de un aminoácido del resto de enlace de un análogo de insulina de cadena única, o el extremo N-terminal del péptido de incretina o componentes del péptido de insulina del conjugado.

60 [0167] En una realización, el elemento de dipéptido profármaco comprende la estructura general de la Fórmula X:

5



10

en la que

R₁, R₂, R₄ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H, alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₁-C₁₈) OH, (alquilo C₁-C₁₈) SH, (alquilo C₂-C₃) SCH₃, (alquilo C₁-C₄) CONH₂, (alquilo C₁-C₄) COOH, (alquilo C₁-C₄) NH₂, (Alquilo C₁-C₄)NHC(NH₂⁺) NH₂, (alquilo C₀-C₄) (cicloalquilo C₃-C₆), (alquilo C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅),

15

(Alquilo C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀) R₇, (alquilo C₁-C₄) (heteroarilo C₃-C₉) y alquilo C₁-C₁₂ (W) alquilo C₁-C₁₂, en el que W es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, S y O, o R₁ y R₂ junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo o arilo C₃-C₁₂; o R₄ y R₈ junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₆;

20

R₃ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₁-C₁₈) OH, (alquilo C₁-C₁₈) NH₂, (alquilo C₁-C₁₈) SH, (alquilo C₀-C₄) (cicloalquilo C₃-C₆), (alquilo C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (alquilo C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀) R₇, y (alquilo C₁-C₄) (heteroarilo C₃-C₉) o R₄ y R₃ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros;

R₅ es NHR₆ u OH;

25

R₆ es H, alquilo C₁-C₈ o R₆ y R₂ junto con los átomos a los que están unidos forman un 4, 5 o 6 miembro de anillo heterocíclico; y

R₇ se selecciona del grupo que consiste en H y OH. En una realización, cuando el elemento profármaco está unido a la amina N-terminal del conjugado de incretina-insulina y R₄ y R₃ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros, entonces al menos uno de R₁ y R₂ es distinto de H.

30

[0168] De acuerdo con una realización se proporciona un conjugado de profármaco increlin/insulina que comprende la estructura: A-B-C-Q;

en donde Q es un conjugado de increlina/insulina como se describe en el presente documento;

35

A es un aminoácido o ácido hidroxílico que comprende una cadena lateral, opcionalmente (alquil C₁-C₈) NH₂, en el que la cadena lateral de A está unida covalentemente a un resto que se une irreversiblemente a una proteína plasmática de mamífero, que incluye, por ejemplo, albúmina de suero. En una realización, la cadena lateral de A está unida covalentemente a un grupo acilo o alquilo, que incluye un ácido graso, ácido cólico, sales biliares o resto esteroide de un ácido biliar, que es preferiblemente al menos 18, 19, 20, 21 o 22 carbonos de longitud. En una realización, la cadena lateral de A se une covalentemente a un C₁₆-C₃₀ grupo acilo o un C₁₆-C₃₀ grupo alquilo;

40

B es un aminoácido N-alquilado; y

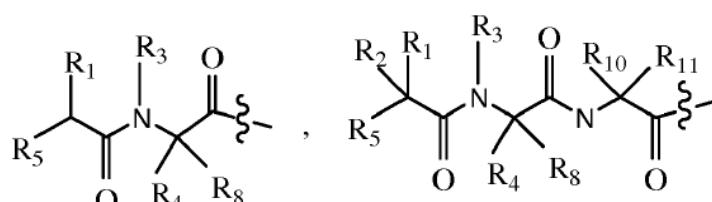
C es un enlace amida, X₇₀ o X₇₀ X₇₁, en donde X₇₀ y X₇₁ son aminoácidos seleccionados independientemente del grupo que consiste en glicina, ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteíco, ácido homocisteíco, ácido homoglutámico, arginina, lisina e histidina, en la que ABCse une a Q a través de un enlace amida a través de un grupo amino alifático de Q.

45

[0169] Opcionalmente, el enlace entre la cadena lateral de A y el grupo acilo o alquilo se realiza mediante un espaciador, en el que el espaciador comprende uno o dos aminoácidos cargados. De acuerdo con una realización, la estructura A-B-C está ligada a Q a través de un enlace amida en un grupo amino alifático seleccionado del grupo alfa amino en el aminoácido N-terminal del péptido de incretina, la cadena A o la cadena B, o una grupo amino alifático en una cadena lateral de un aminoácido B3, B28 o B29 del péptido de insulina. De acuerdo con una forma de realización B es un amino ácido N-alquilados con alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₃-C₁₈, (alquilo C₀-C₄) (cicloalquilo C₄-C₆), (alquilo C₀-C₄) (heterocíclico C₃-C₅), o (alquilo C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀).

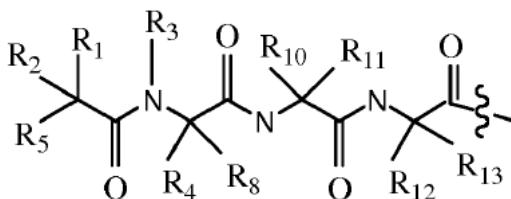
55

[0170] En otra realización, A-B-C comprende una estructura de:



o

5



10

15 En las que

 R_1 es (alquil C₁-C₆)NH-R₉ o (alquil C₁-C₆) NH-S₁-R₉; R_2 es H o alquilo C₁-C₆; R_3 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₂-C₄, alquenilo C₃-C₈, (alquil C₀-C₄) (cicloalquilo C₄-C₆), (alquil C₀-C₄) (heterocíclico C₃-C₅), (alquil C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀) y (alquil C₁-C₄) (heteroarilo C₆-C₁₀), o R₄ y R₃ junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros;

20

R₄, y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H, alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈) OH, (alquil C₁-C₁₈) SH, (Alquil C₂-C₃)SCH₃, (alquilo C₁-C₄)CONH₂, (alquilo C₁-C₄) COOH, (alquilo C₁-C₄) NH₂, (alquilo C₁-C₄) NHC(NH₂⁺)NH₂, (alquilo C₀-C₄) (cicloalquilo C₃-C₆), (alquilo C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (alquilo C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀) R₇, (alquilo C₁-C₄) (heteroarilo C₃-C₉), y alquilo C₁-C₁₂ (W₁) alquilo C₁-C₁₂, en donde W₁ es un

25

heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, S y O, o R₄ y R₈ junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₆;R₅ es NHR₆ u OH;R₆ es H o alquilo C₁-C₈;

30

R₇ se selecciona del grupo que consiste en H, OH, alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₄) NH₂, y (alquilo C₀-C₄) OH;R₉ se selecciona del grupo que consiste en acilo C₁₈-C₃₀;R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, CH₂, CHO_H, CH₂SH, (alquilo C₁-C₄) COOH, (alquilo C₁-C₄) NH₂, (Alquilo C₁-C₄) NHC(NH₂⁺)NH₂ y CH₂(C₃-N₂ heterocíclico); y

35

S₁ es un espaciador que consiste en uno o dos aminoácidos cargados seleccionados del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteíco, ácido homocisteíco, ácido homoglutámico, arginina, lisina e histidina, en el que ABC está unido a Q a través de una amida enlazar mediante un grupo amino alifático de Q. En una realización, R₁ es (alquil C₁-C₆) NH-S₁-R₉; R₃ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₂-C₄; R₂, R₄, R₁₁ y R₁₃ son cada uno H; R₅ es NH₂; R₈ es H o alquilo C₁-C₈; R₉ es acilo C₁₈-C₃₀; R₁₀ y R₁₂ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en (alquilo C₁-C₄) COOH, (alquilo C₁-C₄) NH₂ y (alquilo C₁-C₄)

40

NHC(NH₂⁺)NH₂; y S₁ es un espaciador que comprende uno o dos cargadas aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteíco, ácido homocisteíco, el ácido homoglutámico, arginina, lisina e histidina.

45

[0171] En una realización adicional, el elemento de péptido profármaco A-B-C como se describe en los párrafos anteriores inmediatos se modifican adicionalmente para evitar la escisión del elemento de péptido profármaco durante el almacenamiento y antes de la administración a un paciente. En una realización, la amina N-terminal del elemento de profármaco peptídico se une a un resto que permanece unido al N-terminal hasta la administración al paciente. En una realización, el profármaco de insulina de fórmula A-B-C-Q comprende además un resto escindible con enzima sérica unida a A mediante la amina N-terminal de A. En una realización, el resto escindible con enzima es un péptido que se escinde por dipeptidil peptidasa IV (DPP- IV), que incluye, por ejemplo, un dipéptido de Arg-Pro, Lys-Pro o Glu-Pro.

50

Péptidos relacionados con el glucagón

55

[0172] Los análogos solicitantes han descubierto de glucagón que tienen actividades alteradas en el glucagón, los receptores de GLP1 y GIP. Cualquiera de estos análogos (denominados generalmente incretinas) se puede utilizar como péptido relacionado con glucagón en los conjugados descritos en este documento. Más particularmente, el péptido relacionado con glucagón puede ser cualquiera de los péptidos de glucagón de clase 1, clase 2 o clase 3 descritos en este documento.

60

Péptidos relacionados con glucagón de clase 1

65

[0173] En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es una péptido relacionado con glucagón de clase 1, que se describe en el presente documento y en la Solicitud de Patente Internacional Nº PCT US2009/47437 (presentada el 16 de junio de 2009) y la Solicitud de Patente Internacional Nº WO 2008/086086, publicado el 17 de

julio de 2008.

[0174] Las secuencias biológicas referenciados en la sección siguiente (SEQ ID NOs: 801-915) relativos a la clase 1 de glucagón péptidos relacionados corresponden a SEQ ID NOs: 1-115 en Solicitud de Patente Internacional No. 5 PCT US2009/47437.

Actividad

[0175] Los péptidos relacionados con el glucagón de clase 1 retienen la actividad del receptor de glucagón en 10 relación con el péptido de glucagón nativo (SEQ ID NO: 801). Por ejemplo, el péptido relacionado con el glucagón puede retener al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75% de actividad, 80% de actividad, 85% de actividad o 90% de la actividad de glucagón nativo (calculado como la relación inversa de CE50 para el péptido relacionado con glucagón frente al glucagón, por ejemplo, medido mediante la producción de AMPc usando el ensayo generalmente descrito en el Ejemplo 7). En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con el glucagón 15 de Clase 1 tienen la misma o mayor actividad (utilizado como sinónimo del término "potencia" en el presente documento) que el glucagón. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con el glucagón descritos en el presente documento no muestran más de aproximadamente el 100%, 1000%, 10.000%, 100.000% o 1.000.000% de la actividad del péptido de glucagón nativo.

20 Solubilidad mejorada

[0176] El glucagón nativo exhibe escasa solubilidad en solución acuosa, particularmente a pH fisiológico, con 25 tendencia a agregarse y precipitar con el tiempo. Por el contrario, los péptidos relacionados con glucagón de Clase 1 en algunas realizaciones exhiben al menos 2 veces, 5 veces o incluso mayor solubilidad en comparación con el glucagón nativo a un pH entre 6 y 8, o entre 6 y 9, por ejemplo, a pH 7 después de 24 horas a 25 ° C.

[0177] Por consiguiente, en algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1 se ha modificado 30 con respecto al péptido de tipo salvaje de His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr -Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 801) para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas, particularmente en un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, mientras se retiene la actividad biológica del péptido nativo.

[0178] Por ejemplo, la solubilidad de cualquiera de los péptidos relacionados con el glucagón de Clase 1 descritos 35 en el presente documento puede mejorarse más uniendo un resto hidrófilo al péptido. La introducción de tales grupos también aumenta la duración de la acción, por ejemplo, medida por una vida media prolongada en la circulación. Los restos hidrófilos se describen adicionalmente en el presente documento.

Modificación con residuos cargados

[0179] En algunas realizaciones, la solubilidad se mejoró mediante la adición de carga a la Clase 1 glucagón péptido relacionado por la sustitución de nativo no cargado aminoácidos con cargada amino ácidos seleccionados del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y glutámico ácido, o mediante la adición de aminoácidos cargados al extremo amino o carboxi del péptido.

[0180] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con la clase 1 de glucagón tiene una solubilidad mejorada debido al hecho de que el péptido es modificado por amino sustituciones y/o adiciones de ácido que introducir un cargaron amino ácido en la porción C-terminal del péptido, y en algunas realizaciones en una posición C-terminal a la posición 27 de SEQ ID NO: 801. Opcionalmente, se pueden introducir uno, dos o tres aminoácidos cargados dentro de la porción C-terminal, y en algunas realizaciones C-terminal a la posición 27. De acuerdo con 50 algunas realizaciones, los aminoácidos nativos en las posiciones 28 y/o 29 se sustituyen con un aminoácido cargado, y/o se añaden de uno a tres aminoácidos cargados al extremo C-terminal del péptido, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En realizaciones ejemplares, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados positivamente.

[0181] En realizaciones ejemplares específicas, el péptido relacionado con el glucagón de Clase 1 puede 55 comprender uno cualquiera o dos de las siguientes modificaciones: sustitución de N28 con E; sustitución de N28 por D; sustitución de T29 por D; sustitución de T29 por E; inserción de E después de la posición 27, 28 o 29; inserción de D después de la posición 27, 28 o 29. Por ejemplo, D28E29, E28E29, E29E30, E28E30, D28E30.

[0182] De acuerdo con una realización ejemplar, el péptido relacionado con la clase 1 de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 811, o un análogo del mismo que contiene de 1 a 3 modificaciones de 60 aminoácidos adicionales (que se describen en este documento en referencia a los agonistas de glucagón) con relación al glucagón nativo, o un análogo agonista del glucagón del mismo. SEQ ID NO: 811 representa un péptido relacionado con glucagón de Clase 1 modificado, en el que el residuo de asparagina en la posición 28 de la proteína 65

- 5 nativa se ha sustituido con un ácido aspártico. En otra realización ejemplar, el péptido relacionado con glucagón de Clase 1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 838, en la que el residuo de asparagina en la posición 28 de la proteína nativa se ha sustituido con ácido glutámico. Otras realizaciones ejemplares incluyen péptidos relacionados con glucagón de Clase 1 de SEQ ID NOS: 824, 825, 826, 833, 835, 836 y 837.
- 10 5 Estabilidad mejorada
- [0183] Cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 pueden presentar, además, una mayor estabilidad y/o reducción de la degradación, por ejemplo, retener al menos 95% del péptido original después de 24 horas a 25 ° C. Los péptidos relacionados con el glucagón de Clase 1 pueden incluir modificaciones adicionales que alteren sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo, mayor potencia, vida media prolongada en circulación, vida útil aumentada, precipitación o agregación reducida y/o degradación reducida, por ejemplo, aparición reducida de escisión o modificación química después del almacenamiento.
- 15 10 [0184] En otras realizaciones adicionales a modo de ejemplo, cualquiera de los anteriores de la Clase 1 de glucagón péptidos relacionados se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido en la posición 15 de la SEQ ID NO: 801 para reducir la degradación del péptido con el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos. En realizaciones ejemplares, Asp en la posición 15 está sustituido con Glu, homó-Glu, ácido cisteíco u ácido homó-cisteíco.
- 20 15 [0185] Alternativamente, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en este documento se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido en la posición 16 de la SEQ ID NO: 801. En realizaciones ejemplares, Ser en la posición 16 está sustituido con Thr o AIB, o cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas en este documento con respecto a los péptidos relacionados con el glucagón de Clase 1 que mejoran la potencia en el receptor de glucagón. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace peptídico entre Asp15-Ser16.
- 25 20 [0186] En algunas realizaciones, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en este documento se pueden modificar adicionalmente para reducir la degradación en varias posiciones de aminoácidos mediante la modificación de una cualquiera, dos, tres, o los cuatro de las posiciones 20, 21, 24, o 27. Realizaciones ejemplares incluyen la sustitución de Gln en la posición 20 con Ser, Thr, Ala o AIB, la sustitución de Asp en la posición 21 con Glu, la sustitución de Gln en la posición 24 con Ala o AIB, la sustitución de Met en la posición 27 con Leu o Nle. La eliminación o sustitución de la metionina reduce la degradación debida a la oxidación de la metionina. La eliminación o sustitución de Gln o Asn reduce la degradación debida a la desamidación de Gln o Asn. La eliminación o sustitución de Asp reduce la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclico seguido de isomerización a isoaspartato.
- 30 25 Potencia mejorada
- 35 30 [0187] De acuerdo con otra realización, se proporcionan clase 1 péptidos relacionados con el glucagón que han mejorado la potencia en el receptor de glucagón, en el que los péptidos comprenden un aminoácido modificación en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 801). A modo de ejemplo no limitativo, tal potencia mejorada se puede proporcionar sustituyendo la serina natural en la posición 16 con ácido glutámico o con otro aminoácido cargado negativamente que tenga una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico o ácido homocisteíco, o un aminoácido cargado que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, P) y con una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos. La sustitución de la serina en la posición 16 por ácido glutámico aumenta la actividad del glucagón al menos 2 veces, 4 veces, 5 veces y hasta 10 veces mayor en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 1 retiene la selectividad por el receptor de glucagón en relación con los receptores de GLP-1, por ejemplo, al menos una selectividad de 5, 10 o 15 veces.
- 40 35 Resistencia a DPP-IV
- 45 40 [0188] En algunas realizaciones, los 1 glucagón péptidos relacionadas con la clase descritos en este documento se modifican adicionalmente en la posición 1 o 2 para reducir la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 1 y/o la posición 2 del péptido relacionado con glucagón de Clase 1 se sustituye con el aminoácido o aminoácidos resistentes a DPP-IV descritos en este documento. En algunas realizaciones, la posición 2 del péptido análogo está sustituida con un ácido aminoisobutírico. En algunas realizaciones, la posición 2 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, glicina, N-metil serina y ácido ε-amino butírico. En otra realización, la posición 2 del péptido relacionado con el glucagón de Clase 1 está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, glicina y ácido aminoisobutírico. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 2 no es D-serina.
- 50 45 [0189] La reducción de la actividad del glucagón tras la modificación de los aminoácidos en la posición 1 y/o la

5 posición 2 del péptido relacionado con glucagón se puede restaurar mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la porción C-terminal del péptido relacionado con glucagón (alrededor de aminoácidos 12-29). La estructura de hélice alfa se puede estabilizar, por ejemplo, mediante la formación de un puente intramolecular covalente o no covalente (por ejemplo, un puente de lactama entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones "i" e "i + 4", donde i es un número entero de 12 a 25), sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido disustituido en α , α), como se describe adicionalmente en el presente documento.

10 Modificaciones en la posición 3

10 [0190] La actividad del receptor de glucagón se puede reducir mediante una modificación de aminoácidos en la posición 3 (de acuerdo con la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo salvaje), por ejemplo, la sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 3, por un ácido, básico o hidrófobo, aminoácidos. Por ejemplo, la sustitución en la posición 3 con ácido glutámico, ornitina o norleucina reduce o destruye sustancialmente la actividad del receptor de glucagón.

15 [0191] La actividad mantenida o mejorada en el receptor de glucagón se puede lograr modificando el Gln en la posición 3 con un análogo de glutamina como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 863, SEQ ID NO: 869, SEQ ID NO: 870, SEQ ID NO: 871, SEQ ID NO: 872, SEQ ID NO: 873 y SEQ ID NO: 874.

20 Mejora de la actividad de GLP-1 con amidas y ésteres C-terminales

25 [0192] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal con un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster. Por el contrario, retener el ácido carboxílico nativo en el extremo C-terminal del péptido mantiene la selectividad relativamente mayor del péptido relacionado con el glucagón de Clase 1 para el receptor de glucagón frente al receptor de GLP-1 (p. Ej., Mayor que aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 veces).

30 Otras modificaciones y combinaciones

35 [0193] Las modificaciones adicionales pueden ser hechas a la Clase péptido relacionado con glucagón 1 que puede aumentar aún más la actividad de glucagón solubilidad y/o estabilidad y/o. El péptido relacionado con glucagón de Clase 1 puede comprender alternativamente otras modificaciones que no afecten sustancialmente a la solubilidad o estabilidad y que no disminuyan sustancialmente la actividad del glucagón. En realizaciones ejemplares, el péptido relacionado con glucagón de Clase 1 puede comprender un total de hasta 11, o hasta 12, o hasta 13, o hasta 14 modificaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de glucagón nativa. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones, adiciones o delecciones conservadoras o no conservadoras en cualquiera de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27., 28 o 29.

40 40 Modificaciones ejemplares del péptido relacionado con glucagón de Clase 1 incluyen, pero no se limitan a:

(a) sustituciones no conservadoras, sustituciones conservadoras, adiciones o delecciones mientras se retiene al menos una actividad agonista de glucagón parcial, por ejemplo, sustituciones conservadoras en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29, sustitución de Tyr en la posición 10 por Val o Phe, sustitución de Lys en la posición 12 por Arg, sustitución de una o más de estas posiciones por Ala;

45 (b) delección de aminoácidos en las posiciones 29 y/o 28, y opcionalmente en la posición 27, mientras se retiene al menos una actividad agonista de glucagón parcial;

(c) modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, mediante sustitución con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteíco o ácido homocisteíco, que puede reducir la degradación; o modificación de la serina en la posición 16, por ejemplo, por sustitución de treonina, AIB, ácido glutámico o con otro aminoácido cargado negativamente que tenga una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteíco, que igualmente puede reducir la degradación debida a la escisión del enlace Asp15-Ser16;

50 (d) adición de un resto hidrófilo tal como el polímero polietilenglicol soluble en agua, como se describe en este documento, por ejemplo, en la posición 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40 o en el aminoácido C-terminal, que puede aumentar la solubilidad y/o vida media;

(e) modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, por sustitución con leucina o norleucina, para reducir la degradación oxidativa;

55 (f) modificación de Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, por sustitución con Ser, Thr, Ala o AIB, para reducir la degradación que ocurre a través de la desamidación de Gln

(g) modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, por sustitución con Glu, para reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclico seguido de isomerización a isoaspartato;

60 (h) modificaciones en la posición 1 o 2 como se describe en el presente documento que mejoran la resistencia a la escisión de DPP-IV, opcionalmente en combinación con un puente intramolecular como un puente de lactama entre

- las posiciones "i" e "i + 4", en donde i es un número entero de 12 a 25, por ejemplo, 12, 16, 20, 24;
- (i) acilar o alquilar el péptido relacionado con el glucagón como se describe en este documento, que puede aumentar la actividad en el receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1, aumentar la vida media en la circulación y/o extender la duración de la acción y/o retrasar el inicio de la acción, opcionalmente combinado con la adición de un resto hidrófilo, adicional o alternativamente, opcionalmente combinado con una modificación que reduce selectivamente la actividad en el péptido GLP-1, por ejemplo, una modificación del Thr en la posición 7, tal como una sustitución de la Thr en la posición 7 con un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile; eliminar los aminoácidos C-terminales del aminoácido en la posición 27 (por ejemplo, eliminar uno o ambos de los aminoácidos en las posiciones 28 y 29, dando un péptido de 27 o 28 aminoácidos de longitud);
- (j) extensiones C-terminal como se describe en este documento;
- (k) homodimerización o heterodimerización como se describe en este documento; y combinaciones de (a) a (k).
- [0194] En algunas realizaciones, las modificaciones ejemplares de los péptido relacionadas con la clase 1 de glucagón incluyen al menos un amino modificación ácido seleccionado del Grupo A y uno o más amino modificaciones de ácido seleccionado del Grupo B y/o el Grupo C, en el que el grupo A es:
- sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado;
- sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico;
- 20 sustitución en la posición 28 con Asn, Asp o Glu;
- sustitución en la posición 28 con Asp;
- sustitución en la posición 28 con Glu;
- sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado;
- 25 sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico;
- sustitución en la posición 29 con Asp, Glu o Lys;
- sustitución en la posición 29 con Glu;
- 30 inserción de 1-3 aminoácidos cargados después de la posición 29;
- inserción después de la posición 29 de Glu o Lys;
- inserción después de la posición 29 de Gly-Lys o Lys-Gly;
- 35 o combinaciones de los mismos;
- en donde el Grupo B es:
- sustitución de Asp en la posición 15 por Glu;
- sustitución de Ser en la posición 16 por Thr o AIB;
- y donde el Grupo C es:
- 35 sustitución de His en la posición 1 con un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad del péptido relacionado con el glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
- sustitución de Ser en la posición 2 por un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad de el péptido relacionado con glucagón para la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
- 40 sustitución de Lys en la posición 12 por Arg;
- sustitución de Gln en la posición 20 por Ser, Thr, Ala o AIB;
- sustitución de Asp en la posición 21 por Glu;
- sustitución de Gln en la posición 24 por Ser, Thr, Ala o AIB;
- 45 sustitución de Met en la posición 27 por Leu o Nle;
- deleción de aminoácidos en las posiciones 27-29;
- deleción de aminoácidos en las posiciones 28-29;
- deleción del aminoácido en las posiciones 29;
- o combinaciones de los mismos.
- 50 [0195] En realizaciones de ejemplo, Lys en la posición 12 se sustituye con Arg. En otras realizaciones ejemplares, se eliminan los aminoácidos en las posiciones 29 y/o 28, y opcionalmente en la posición 27.
- [0196] En algunas realizaciones específicas, los relacionados con el glucagón péptido comprende (a) un amino modificación ácido en la posición 1 y/o 2 que la resistencia confiere DPP-IV, por ejemplo, la sustitución con DMIA en la posición 1, o AIB en la posición 2, (b) un puente intramolecular dentro de las posiciones 12-29, por ejemplo, en las posiciones 16 y 20, o una o más sustituciones de los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 con un aminoácido disustituido en α , α , opcionalmente (c) unido a un resto hidrófilo como PEG, por ejemplo, a través de Cys en la posición 24, 29 o en el aminoácido C-terminal, opcionalmente (d) una modificación de aminoácido en la posición 27 que sustituye Met con, por ejemplo, Nle, opcionalmente (e) modificaciones de aminoácidos en las posiciones 20, 21 y 24 que reducen la degradación, y opcionalmente (f) enlazadas a SEQ ID NO: 820. Cuando el péptido relacionado con glucagón está enlazado a SEQ ID NO: 820, el aminoácido en la posición 29 en ciertos realizaciones es Thr o Gly. En otras realizaciones específicas, el péptido relacionado con el glucagón comprende (a) Asp28Glu29, Glu28Glu29, Glu29Glu30, Glu28Glu30 o Asp28Glu30, y opcionalmente (b) una modificación de aminoácido en la posición 16 que sustituye a Ser con, por ejemplo, Thr o AIB, y opcionalmente (c) una modificación de aminoácidos en la posición 27 que sustituye Met con, por ejemplo, Nle, y opcionalmente (d) modificaciones de

aminoácidos en las posiciones 20, 21 y 24 que reducen la degradación. En una realización específica, el péptido relacionado con glucagón es T16, A20, E21, A24, Nle27, D28, E29.

5 [0197] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 1 comprende la secuencia de aminoácidos:

X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp- Leu-Met-Zi (SEQ ID NO: 839) con 1 a 3 modificaciones de aminoácidos a la misma, donde X1 y/o X2 es un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad (o aumenta la resistencia) del péptido relacionado con glucagón a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), en la que Z₁ se selecciona del grupo que consiste en-COOH (el carboxilito C-terminal natural), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH e Y-COOH, donde Y es de 1 a 2 aminoácidos, y donde un puente intramolecular, preferiblemente un enlace covalente, conecta las cadenas laterales de un aminoácido en la posición i y un aminoácido en la posición i + 4, donde i es 12, 16, 20 o 24.

10 [0198] En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente de lactama. En algunas realizaciones, los aminoácidos en las posiciones i e i + 4 de SEQ ID NO: 839 son Lys y Glu, por ejemplo, Glu16 y Lys20. En algunas realizaciones, X1 se selecciona del grupo que consiste en: D-His, N-metil-His, alfa-metil-His, ácido imidazol acético, des-amino-His, hidroxil-His, acetil-His, homo-His y ácido alfa, alfa-dimetilimidazol acético (DMIA). En otras realizaciones, X2 se selecciona del grupo que consiste en: D-Ser, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, Val y ácido alfa, aminoisobutírico (AIB). En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón está unido covalentemente a un resto hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, dentro de una extensión C-terminal o en el aminoácido C-terminal.. En realizaciones ejemplares, este resto hidrófilo está unido covalentemente a un resto Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetilfenilalanina en cualquiera de estas posiciones. Ejemplos de restos hidrófilos incluyen polietilenglicol (PEG), por ejemplo, de un peso molecular de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton, o de aproximadamente 20.000 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton.

15 [0199] En otras realizaciones, el péptido relacionado con la clase I de glucagón comprende la secuencia de aminoácidos: X1-X2-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser -Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Zi (SEQ ID NO: 839), donde X1 y/o X2 es un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad de (o aumenta la resistencia de) el péptido relacionado con el glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), en el que una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 20, 21 y 24 del péptido relacionado con el glucagón se sustituye por un α, α-aminoácido disustituido, y en el que Z₁ se selecciona del grupo que consiste en-COOH (el carboxilito C-terminal de origen natural), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH e Y-COOH, donde Y es 1 a 2 aminoácidos.

20 [0200] Los ejemplos de otros aminoácidos modificaciones de ácido a lo anterior Clase 1 péptidos o análogos relacionados con el glucagón incluyen la sustitución de Thr en la posición 7 con un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, ácido aminobutírico (Abu), Ile, opcionalmente, en combinación con la sustitución o adición de un aminoácido que comprende una cadena lateral unida covalentemente (opcionalmente, a través de un espaciador) a un grupo acilo o alquilo, cuyo grupo acilo o alquilo no es nativo de un aminoácido de origen natural, 25 sustitución de Lys en la posición 12 con Arg; sustitución de Asp en la posición 15 por Glu; sustitución de Ser en la posición 16 por Thr o AIB; sustitución de Gln en la posición 20 por Ser, Thr, Ala o AIB; sustitución de Asp en la posición 21 por Glu; sustitución de Gln en la posición 24 por Ser, Thr, Ala o AIB; sustitución de Met en la posición 27 por Leu o Nle; sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado; sustitución de Asn en la posición 28 30 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico; sustitución en la posición 28 con Asn, Asp o Glu; sustitución en la posición 28 con Asp; sustitución en la posición 28 con Glu; sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado; sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico; sustitución en la posición 29 con Asp, Glu o Lys; sustitución en la posición 29 con Glu; 35 inserción de 1-3 aminoácidos cargados después de la posición 29; inserción en la posición 30 (es decir, después de la posición 29) de Glu o Lys; opcionalmente con inserción en la posición 31 de Lys; adición de SEQ ID NO: 820 al extremo C-terminal, opcionalmente, en el que el aminoácido en la posición 29 es Thr o Gly; sustitución o adición de 40 un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo; o una combinación de los mismos.

45 [0201] Cualquier de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a la clase 1 agonistas de glucagón que aumentan la actividad del receptor de glucagón, retienen la actividad del receptor de glucagón parcial, mejorar la solubilidad, el aumento de estabilidad, o reducen la degradación se puede aplicar a la Clase 1 péptidos relacionados con el glucagón individualmente o en combinación.

50 Ejemplos de realizaciones de péptidos relacionados con glucagón de clase 1

55 [0202] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido similar al glucagón nativo de la SEQ ID NO: 801 es modificado por la sustitución del aminoácido nativo en la posición 28 y/o 29 con una carga negativa amino ácido (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) y opcionalmente la adición de un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) al extremo carboxi terminal del péptido. En una realización alternativa, el péptido de glucagón nativo de SEQ ID NO: 801 se modifica mediante la sustitución del aminoácido

5 nativo en la posición 29 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) y, opcionalmente, la adición de uno o dos aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en el extremo carboxi terminal del péptido. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón que tiene una solubilidad y estabilidad mejoradas en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 834 con la condición de que al menos uno de los aminoácidos en la posición 28 o 29 esté sustituido con un ácido. se añade un aminoácido y/o un aminoácido ácido adicional en el extremo carboxi de la SEQ ID NO: 834. En algunas realizaciones, los aminoácidos ácidos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico.

- 10 10 [0203] De acuerdo con algunas realizaciones se proporciona un glucagón agonista que tiene una mejor solubilidad y estabilidad en el que el agonista comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 833, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 27, 28 o 29 está sustituido con un residuo de aminoácido no nativo (es decir, al menos un aminoácido presente en la posición 27, 28 o 29 del análogo es un aminoácido ácido diferente del aminoácido presente en la posición correspondiente en SEQ ID NO: 801). De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un agonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 833 con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 28 es asparagina y el aminoácido en la posición 29 es treonina, el péptido comprende además uno o dos aminoácidos. ácidos, seleccionados independientemente del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu, añadidos al extremo carboxi del péptido relacionado con glucagón. De acuerdo con algunas realizaciones, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido nativo se cambia a leucina o norleucina para prevenir la degradación oxidativa del péptido.

15 20 [0204] En algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: se presentó 833 que de 1 a 6 aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 24 del análogo difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 801. De acuerdo con otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 833 en el que de 1 a 3 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 24 del análogo difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 801. En otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 807, SEQ ID NO: 808 o SEQ ID NO: 834 en el que 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21 o 24 del análogo difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 801, y en una realización adicional, esos uno a dos aminoácidos diferentes representan sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto al aminoácido. ácido presente en la secuencia nativa (SEQ ID NO: 801). En algunas realizaciones, se proporciona un péptido relacionado con glucagón de SEQ ID NO: 811 o SEQ ID NO: 813 en el que el péptido relacionado con glucagón comprende además una, dos o tres sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27 o 29. En algunas realizaciones, las sustituciones en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 27 o 29 son sustituciones de aminoácidos conservativas.

25 30 35 [0205] En algunas realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 801 en el que los difiere analógicas de SEQ ID NO: 801 por tener un amino ácido distinto de serina en la posición 2 y por tener un aminoácido ácido sustituido para el aminoácido nativo en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 801. En algunas realizaciones, el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico. En algunas realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o SEQ ID NO: 832 en el que el análogo difiere de la molécula parental por una sustitución en la posición 2. Más particularmente, la posición 2 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, alanina, D-alanina, glicina, n-metilserina y ácido aminoisobutírico.

40 45 50 55 [0206] En otra realización, un glucagón agonista está previsto que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 801 en el que los difiere analógicas de SEQ ID NO: 801 por tener un amino ácido distinto de histidina en la posición 1 y por tener un aminoácido ácido sustituidos para el aminoácido nativo en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 801. En algunas realizaciones, el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico. En algunas realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o SEQ ID NO: 832 en el que el análogo difiere de la molécula original por una sustitución en la posición 1. Más particularmente, la posición 1 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en DMIA, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina.

60 65 [0207] De acuerdo con algunas realizaciones, el glucagón modificado péptido relacionado comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 y SEQ ID NO: 832. En una realización adicional se proporciona un péptido relacionado con glucagón que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o SEQ ID NO: 832 que comprende además de uno a dos aminoácidos, añadidos al extremo C-terminal de SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o SEQ ID NO: 832, en donde los aminoácidos adicionales se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp Glu, ácido cisteico o ácido homocisteico. En algunas realizaciones, los aminoácidos adicionales añadidos al terminal carboxi se seleccionan del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu o en una realización adicional los

aminoácidos adicionales son Asp o Glu.

[0208] En otra realización, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 o un glucagón agonista análogo de la misma. En algunas realizaciones, el péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 808, SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811, SEQ ID NO: 812 y SEQ ID NO: 813. En otra realización, el péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 808, SEQ ID NO: 810 y SEQ ID NO: 811. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 808, SEQ ID NO: 810 y SEQ ID NO: 811 que comprende además un aminoácido adicional, seleccionado del grupo que consiste en Asp y Glu, añadido al extremo C-terminal del péptido relacionado con glucagón. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811 o SEQ ID NO: 813, y en una realización adicional, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811.

[0209] De acuerdo con algunas realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido relacionados con el glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en:
 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln -Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 834),
 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr-R (SEQ ID NO: 811) y
 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Glu-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asp-Thr -R (SEQ ID N.^o: 813)

donde Xaa en la posición 15 es Asp, Glu, ácido cisteíco, ácido homoglutámico u ácido homocisteíco, Xaa en la posición 28 es Asn o un aminoácido ácido y Xaa en la posición 29 es Thr o un aminoácido ácido y Res un aminoácido ácido ácido, COOH o CONH₂, con la condición de que esté presente un residuo ácido en una de las posiciones 28, 29 o 30. En algunas realizaciones, Res COOH, y en otra realización Res CONH₂.

[0210] La presente descripción también abarca péptidos de fusión de glucagón en el que un segundo péptido se ha fusionado con el C-terminal del péptido relacionados con el glucagón para mejorar la estabilidad y la solubilidad del péptido relacionado con glucagón. Más particularmente, el péptido relacionado con el glucagón de fusión puede comprender un análogo agonista del glucagón que comprende un péptido relacionado con el glucagón NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Xaa-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO: 834), en donde Res un aminoácido ácido o un enlace y un secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNRR) unida al aminoácido carboxi terminal del péptido relacionado con glucagón. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 833, SEQ ID NO: 807 o SEQ ID NO: 808 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNRR) unido al aminoácido carboxi terminal del péptido relacionado con glucagón. En algunas realizaciones, el péptido de fusión de glucagón comprende SEQ ID NO: 802, SEQ ID NO: 803, SEQ ID NO: 804, SEQ ID NO: 805 y SEQ ID NO: 806 o un análogo agonista de glucagón del mismo, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNRR) unida al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón. De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido de fusión comprende además una cadena de PEG unida a un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, 29, dentro de una extensión C-terminal, o en el aminoácido C-terminal, donde la cadena de PEG se selecciona de la gama de 500 a 40.000 Dalton. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNRR) se une al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón a través de un enlace peptídico. En algunas realizaciones, la porción de péptido relacionado con glucagón del péptido de fusión de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811 y SEQ ID NO: 813. En algunas realizaciones, la porción de péptido relacionado con glucagón del El péptido de fusión de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811 o SEQ ID NO: 813, en la que una cadena de PEG está unida en la posición 21, 24, 29, dentro de una extensión C-terminal o en el aminoácido C-terminal, respectivamente.

[0211] En otra realización, la secuencia de péptidos relacionados con el glucagón del péptido de fusión comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNRR) unida al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón. En algunas realizaciones, el péptido de fusión de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 824, SEQ ID NO: 825 y SEQ ID NO: 826. Normalmente, los péptidos de fusión como se describen en este documento tendrán un aminoácido C-terminal con el grupo de ácido carboxílico estándar. Sin embargo, también se incluyen como realizaciones los análogos de aquellas secuencias en las que el aminoácido C-terminal tiene una amida sustituida por el ácido carboxílico. De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con el glucagón de fusión comprende un análogo agonista del glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811 y SEQ ID NO: 813, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 823 (GPSSGAPPPS-CONH₂) unido al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón.

[0212] Los agonistas de glucagón como se describe en el presente documento se pueden modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad y la estabilidad del péptido en soluciones acuosas al tiempo que conserva la actividad biológica del péptido relacionado con glucagón. De acuerdo con algunas realizaciones, se prevé que la introducción de grupos hidrófilos en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido de SEQ ID NO: 811, o un análogo agonista de glucagón del mismo, mejore la solubilidad y estabilidad del pH estabilizan el análogo de glucagón. Más particularmente, en algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811, SEQ ID NO: 813, o SEQ ID NO: 832 se modifica para comprender uno o más grupos hidrófilos unidos covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos presentes en las posiciones 21 y 24 del péptido relacionado con glucagón.

[0213] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de SEQ ID NO: 811 se modifica para contener una o más sustituciones de aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y/o 29, en las que el aminoácido nativo está sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, que incluyen, por ejemplo, PEG. El péptido nativo puede sustituirse con un aminoácido de origen natural o un aminoácido sintético (de origen no natural). Los aminoácidos sintéticos o no naturales se refieren a aminoácidos que no se producen naturalmente *in vivo* pero que, no obstante, pueden incorporarse a las estructuras peptídicas descritas en este documento.

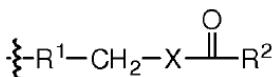
[0214] En algunas realizaciones, un agonista de glucagón de la SEQ ID NO: se proporciona 813 en el que la secuencia del péptido de glucagón natural se ha modificado para contener un aminoácido de origen natural o sintético en al: 810, SEQ ID NO: 811 o la SEQ ID NO al menos una de las posiciones 16, 17, 21, 24, 29, dentro de una extensión C-terminal o en el aminoácido C-terminal de la secuencia nativa, donde el aminoácido sustituto comprende además un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, la sustitución está en la posición 21 o 24, y en una realización adicional, el resto hidrófilo es una cadena de PEG. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de SEQ ID NO: 811 está sustituido con al menos un residuo de cisteína, en el que la cadena lateral del residuo de cisteína se modifica adicionalmente con un reactivo reactivo con tiol, que incluye, por ejemplo, maleimido, vinilsulfona, 2- piridiltio, haloalquilo y haloacilo. Estos reactivos reactivos con tiol pueden contener grupos carboxi, ceto, hidroxilo y éter, así como otros restos hidrófilos, tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, el péptido de glucagón nativo se sustituye con lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina de sustitución se modifica adicionalmente usando reactivos reactivos con amina tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc.) de ácidos carboxílicos o aldehídos de restos hidrófilos tales como como polietilenglicol. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 814, SEQ ID NO: 815, SEQ ID NO: 816, SEQ ID NO: 817, SEQ ID NO: 818 y SEQ ID NO: 819.

[0215] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón pegilado comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unido covalentemente al péptido relacionado con glucagón en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton. En algunas realizaciones, el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido de SEQ ID NO: 806, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es aproximadamente 1.000 a unos 5.000 Dalton. En otra realización, el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido de SEQ ID NO: 806, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es aproximadamente 5,000 a aproximadamente 20,000 Daltons.

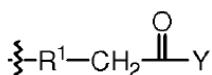
[0216] La cadena de polietilenglicol puede estar en la forma de una cadena lineal o puede ser ramificado. De acuerdo con algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Dalton. En algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Dalton. En otra realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Dalton.

[0217] Cualquiera de los péptidos relacionados con el glucagón descritos anteriormente se pueden modificar adicionalmente para incluir un enlace covalente o puente intramolecular no covalente o una alfa hélice-estabilización de amino ácido dentro de la porción C-terminal del péptido relacionado con glucagón (posiciones de aminoácidos 12 a 29). De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con el glucagón comprende una o más de las modificaciones discutidas anteriormente además de una sustitución de aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 o 24 (o una combinación de las mismas) con un α , α -disustituido aminoácido, por ejemplo, AIB. De acuerdo con otra realización, el péptido relacionado con glucagón comprende una o más modificaciones discutidas anteriormente además de un puente intramolecular, por ejemplo, una lactama, entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 del péptido relacionado con glucagón.

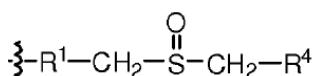
[0218] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 877, en el que el Xaa en la posición 3 es un aminoácido que comprende una cadena lateral de estructura I, II, o III:

**Estructura I**

5

**Estructura II**

10

**Estructura III**

15

20

en la que R¹ es C₀₋₃ alquilo o C₀₋₃ heteroalquilo; R² es NHR⁴ o C₁₋₃ alquilo; R³ es C₁₋₃ alquilo; R⁴ es H o C₁₋₃ alquilo; Xes NH, O o S; e Y es NHR⁴, SR³ u OR³. En algunas realizaciones, Xes NH o Y es NHR⁴. En algunas realizaciones, R¹ es alquilo C₀₋₂ o heteroalquilo C₁. En algunas realizaciones, R² es NHR⁴ o alquilo C₁. En algunas realizaciones, R⁴ es H o alquilo C¹. En realizaciones ejemplares, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de Estructura I en la que, R¹ es CH₂-S, Xes NH y R₂ es CH₃ (acetamidometilcisteína, C(Acm)); R¹ es CH₂, Xes NH y R₂ es CH₃ (ácido acetildiaminobutanoico, Dab (Ac)); R¹ es alquilo C₀, Xes NH, R₂ es NHR⁴ y R₄ es H (ácido carbamoildiaminopropanoico, Dap (urea)); o R¹ es CH₂-CH₂, Xes NH y R₂ es CH₃ (acetilornitina, Orn (Ac)). En realizaciones ejemplares se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de Estructura II, en la que R¹ es CH₂, Y es NHR⁴ y R₄ es CH₃ (metilglutamina, Q (Me)); En realizaciones ejemplares, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de Estructura III en la que R¹ es CH₂ y R⁴ es H (metionina-sulfóxido, M (O)); En realizaciones específicas, el aminoácido de la posición 3 está sustituido con Dab (Ac). Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 863, SEQ ID NO: 869, SEQ ID NO: 871, SEQ ID NO: 872, SEQ ID NO: 873 y SEQ ID NO: 874.

25

30

35

40

45

[0219] En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es un análogo del glucagón péptido relacionado con el de la SEQ ID NO: 877. En aspectos específicos, el análogo comprende cualquiera de los aminoácidos modificaciones ácido descrito en el presente documento, incluyendo: una sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado; una sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteíco y ácido homocisteíco; una sustitución en la posición 28 con Asn, Asp o Glu; una sustitución en la posición 28 con Asp; una sustitución en la posición 28 con Glu; una sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado; una sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteíco y ácido homocisteíco; una sustitución en la posición 29 con Asp, Glu o Lys; una sustitución en la posición 29 con Glu; una inserción de 1-3 aminoácidos cargados después de la posición 29; una inserción después de la posición 29 de Glu o Lys; una inserción después de la posición 29 de Gly-Lys o Lys-Gly; y una combinación de los mismos.

[0220] En ciertas realizaciones, el análogo del glucagón péptido relacionado con el de la SEQ ID NO: 877 comprende un alfa, α -disustituido amino ácido, tal como AIB, en una, dos, tres, o la totalidad de las posiciones 16, 20, 21 y 24. En ciertas realizaciones, el análogo del péptido relacionado con glucagón de SEQ ID NO: 877 comprende uno o más de los siguientes: sustitución de His en la posición 1 con un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad del péptido relacionado con glucagón para la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), sustitución de Ser en la posición 2 con un aminoácido no nativo que reduce la susceptibilidad del péptido relacionado con el glucagón a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), sustitución de Thr en la posición 7 con un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile; sustitución de Tyr en la posición 10 por Phe o Val; sustitución de Lys en la posición 12 por Arg; sustitución de Asp en la posición 15 por Glu, sustitución de Ser en la posición 16 por Thr o AIB; sustitución de Gln en la posición 20 por Ala o AIB; sustitución de Asp en la posición 21 por Glu; sustitución de Gln en la posición 24 por Ala o AIB; sustitución de Met en la posición 27 por Leu o Nle; delección de aminoácidos en las posiciones 27-29; delección de aminoácidos en las posiciones 28-29; delección del aminoácido en las posiciones 29; adición de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 al extremo C-terminal, en el que el aminoácido en la posición 29 es Thr o Gly, o una combinación de los mismos.

[0221] De acuerdo con realizaciones específicas, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 862-867 y 869-874. En ciertas realizaciones, el análogo del péptido relacionado con glucagón que comprende la SEQ ID NO: 877 comprende un resto hidrofílico, por ejemplo, PEG, unido covalentemente al aminoácido en cualquiera de las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y 29 o en el aminoácido C-

65

terminal.

[0222] En ciertas realizaciones, el análogo del péptido relacionado con glucagón que comprende la SEQ ID NO: 877 comprende un ácido amino que comprende una cadena lateral unido covalentemente, opcionalmente, a través de un espaciador, a un grupo acilo o un grupo alquilo, que acilo grupo o El grupo alquilo no es nativo de un aminoácido de origen natural. El grupo acilo en algunas realizaciones es un grupo acilo graso C4 a C30. En otras realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C4 a C30. En aspectos específicos, el grupo acilo o grupo alquilo está unido covalentemente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 10. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 7 es Ile o Abu.

[0223] El agonista de glucagón puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 801-919, opcionalmente con hasta 1, 2, 3, 4, o 5 modificaciones adicionales que retienen la actividad antagonista del glucagón. En determinadas realizaciones, el agonista de glucagón comprende los aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 859-919.

15 Péptidos relacionados con glucagón de clase 2

[0224] En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es un 2 glucagón Clase péptido relacionado con el, que se describe en el presente documento y en la Solicitud de Patente Internacional Nº PCT US2009/47447 (presentada el 16 de junio de 2009), Solicitud Provisional de Estados Unidos No. 61/090,448, y la Solicitud de Estados Unidos No. 61/151,349. Las secuencias biológicas a las que se hace referencia en la siguiente sección (SEQ ID NO: 1001-1262) relacionadas con péptidos relacionados con glucagón de Clase 2 corresponden a las SEQ ID NO: 1-262 en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT US2009/47447.

25 Actividad

[0225] El glucagón nativo no activa el receptor GIP y normalmente tiene aproximadamente el 1% de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor GLP-1. Las modificaciones de la secuencia de glucagón nativo descritas en este documento producen péptidos relacionados con el glucagón de clase 2 que pueden exhibir una potente actividad de glucagón equivalente o mejor que la actividad del glucagón nativo (SEQ ID NO: 1001), una potente actividad de GIP equivalente o mejor que la actividad de GIP (SEQ ID NO: 1004) y/o actividad de GLP-1 potente equivalente o mejor que la actividad de GLP-1 nativo. En este sentido, el péptido relacionado con glucagón de Clase 2 puede ser uno de un coagonista glucagón/GIP, un triagonista glucagón/GIP/GLP-1, un coagonista GIP/GLP-1 o un péptido relacionado con glucagón agonista GIP, como se describe con más detalle en el presente documento.

[0226] En algunas realizaciones, el glucagón Clase 2 péptidos relacionados descritos en este documento muestran una EC50 para la actividad de activación del receptor de GIP de aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con el glucagón de Clase 2 exhiben una CE50 para la activación del receptor de glucagón de aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos.. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con el glucagón de Clase 2 exhiben una CE50 para la activación del receptor de GLP-1 de aproximadamente 100 nM o menos, o aproximadamente 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM. o menos. La activación del receptor se puede medir mediante ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor, por ejemplo, ensayando células HEK293 cotransfectedas con ADN que codifica el receptor y un gen de luciferasa unido al elemento sensible a AMPc como se describe en el Ejemplo 7.

[0227] En algunas realizaciones, la Clase 2 de glucagón péptidos relacionados exhiben actividad tanto en el receptor de glucagón y el receptor de GIP ("glucagón/GIP co-agonistas"). Estos péptidos relacionados con el glucagón de clase 2 han perdido la selectividad del glucagón nativo por el receptor de glucagón en comparación con el receptor GIP. En algunas realizaciones, la CE50 del péptido relacionado con el glucagón de clase 2 en el receptor GIP es menos de aproximadamente 50, 40, 30 o 20 veces diferente (mayor o menor) de su CE50 en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, la potencia GIP del péptido relacionado con el glucagón de Clase 2 es menor que aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de glucagón. En algunas realizaciones, la proporción de CE50 del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 en el receptor GIP dividido por la CE50 del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 en el receptor de glucagón es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5. En algunas realizaciones, la actividad de GLP-1 se ha reducido o destruido significativamente, por ejemplo, por una modificación de aminoácido en la posición 7, una delección del (de los) aminoácido (s) C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28, produciendo un péptido de 27 o 28 aminoácidos, o una combinación de los mismos.

[0228] En otro aspecto, los péptidos relacionados Clase 2 glucagón presentan actividad en el glucagón, GIP y los receptores de GLP-1 ("glucagón/GIP/GLP-1 tri-agonistas"). Estos péptidos relacionados con el glucagón de clase 2 han perdido la selectividad del glucagón nativo por el receptor del glucagón en comparación con los receptores GLP-1 y GIP. En algunas realizaciones, la CE50 del péptido relacionado con el glucagón de Clase 2 en el receptor GIP es menos de aproximadamente 50, 40, 30 o 20 veces diferente (mayor o menor) de sus respectivas CE50 en el

glucagón y Receptores GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia GIP del péptido relacionado con el glucagón de Clase 2 es menor que aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 o 5 veces diferente (mayor o menor) de sus potencias de glucagón y GLP-1. En algunas realizaciones, la relación de la CE50 del tri-agonista en el receptor GIP dividida por la CE50 del tri-agonista en el receptor GLP-1 es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20., 15, 10 o 5.

5 [0229] En otro aspecto más, la clase 2 los péptidos relacionados con el glucagón presentan actividad en los receptores de GLP-1 y GIP, pero en el que la actividad de glucagón se ha reducido significativamente o destruido ("GIP/GLP-1 co-agonistas"), por ejemplo, mediante una modificación de aminoácido en la posición 3. Por ejemplo, la

10 sustitución en esta posición con un aminoácido ácido, básico o hidrófobo (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reduce la actividad del glucagón. En algunas realizaciones, la CE50 del péptido relacionado con glucagón en el receptor GIP es menos de aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su CE50 en el receptor GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia GIP del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 es menos de aproximadamente 25, 20, 15, 10 o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia GLP-1.

15 En algunas realizaciones, estos péptidos relacionados con el glucagón de Clase 2 tienen aproximadamente el 10% o menos de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente el 1-10%, o aproximadamente el 0,1-10%, o más de aproximadamente el 0,1% pero menos de aproximadamente 10%. En algunas realizaciones, la proporción de la CE50 del péptido relacionado con glucagón de clase 2 en el receptor GIP dividida por la CE50 del péptido relacionado con glucagón de clase 2 en el receptor GLP-1 es menor que

20 aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5, y no menos de 1. En algunas realizaciones, la relación de la potencia GIP del péptido relacionado con glucagón Clase 2 en comparación con la potencia GLP-1 del péptido relacionado con glucagón Clase 2 es menos de aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5, y no menos de 1.

25 [0230] En un aspecto adicional, los péptidos relacionados con la clase 2 glucagón presentan actividad en el receptor de GIP, en la que el glucagón y la actividad de GLP-1 se han reducido significativamente o destruido ("GIP péptidos similares al glucagón agonista"), por ejemplo, por amino modificaciones de ácido en las posiciones 3 con Glu y 7 con Ile. En algunas realizaciones, estos péptidos relacionados con el glucagón de Clase 2 tienen aproximadamente el 1-

30 10%, o aproximadamente el 0,1-10%, o más de aproximadamente el 0,1%, 0,5%, o 1% pero menos de aproximadamente 1%, 5% o 10%. En algunas realizaciones, estos péptidos relacionados con el glucagón de Clase 2 también tienen aproximadamente el 10% o menos de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, por ejemplo, aproximadamente el 1-10%, o aproximadamente el 0,1-10%, o más de aproximadamente 0,1 %, 0,5% o 1% pero menos de aproximadamente 1%, 5% o 10%.

35 Modificaciones

[0231] Las modificaciones descritas en este documento en referencia a una clase 2 glucagón péptido relacionados permiten la manipulación de glucagón (SEQ ID NO: 1001) para crear péptidos relacionados con el glucagón que presentan un aumento de la actividad de GIP, la actividad de glucagón, y/o actividad de GLP-1.

Modificaciones que afectan la actividad de GIP

45 [0232] actividad mejorada en el receptor de GIP es proporcionado por un amino ácido modificación en la posición 1.

Por ejemplo, His en la posición 1 está sustituido con un ácido grande, aromático amino, opcionalmente Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro- Phe, cloro-Phe, sulfo-Phe, 4-piridil-Ala, metil-Tyr o 3-amino Tyr. La combinación de Tyr en la posición 1 con la estabilización de la hélice alfa dentro de la región correspondiente a los aminoácidos 12-29 proporcionó un péptido relacionado con el glucagón de clase 2 que activa el receptor GIP así como el receptor GLP-1 y el receptor de glucagón. La estructura de la hélice alfa se puede estabilizar, por ejemplo, mediante la formación de un puente intramolecular covalente o no covalente, o la sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de la hélice alfa (por ejemplo, un α , aminoácido α -disustituido).

55 [0233] La actividad mejorada en el receptor de GIP también es proporcionada por amino modificaciones de aminoácidos en las posiciones 27 y/o 28, y opcionalmente en la posición 29. Por ejemplo, la Met en la posición 27 está sustituido con un gran aminoácido alifático, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 está sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Ala, y el Thr en la posición 29 está sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly. La sustitución con LAG en las posiciones 27-29 proporciona una mayor actividad de GIP en relación con la secuencia nativa de MNT en esas posiciones.

60 [0234] La actividad mejorada en el receptor de GIP también es proporcionada por un amino ácido modificación en la posición 12. Por ejemplo, la posición 12 está sustituido con un, ácido gran alifático no polar amino, opcionalmente Ile. La actividad mejorada en el receptor GIP también se proporciona mediante una modificación de aminoácidos en las posiciones 17 y/o 18. Por ejemplo, la posición 17 está sustituida con un residuo polar, opcionalmente Gln, y la posición 18 está sustituida con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Ala. Una sustitución con QA en las

65 posiciones 17 y 18 proporciona una actividad de GIP aumentada en relación con la secuencia RRnativa en esas

posiciones.

[0235] El aumento de actividad en el receptor de GIP es proporcionada por modificaciones que permiten la formación de un puente intramolecular entre cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones de 12 a 29. Por ejemplo, un puente intramolecular puede estar formado por un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos en las posiciones i e i + 4 o entre las posiciones j y j + 3, o entre las posiciones k y k + 7. En realizaciones exemplares, el puente está entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, 24 y 28, o 17 y 20. En otras realizaciones, se pueden formar interacciones no covalentes tales como puentes salinos entre cargas positivas y negativas aminoácidos en estas posiciones.

[0236] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente, que la actividad del receptor aumento GIP pueden aplicarse individualmente o en combinación. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GIP generalmente proporcionan una mayor actividad de GIP que cualquiera de tales modificaciones tomadas solas.

Modificaciones que afectan la actividad del glucagón

[0237] En algunas realizaciones, el aumento de potencia de glucagón es proporcionado por un amino ácido modificación en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1001). A modo de ejemplo no limitativo, tal potencia mejorada se puede proporcionar sustituyendo la serina natural en la posición 16 con ácido glutámico o con otro aminoácido cargado negativamente que tenga una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, o un aminoácido cargado que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, P) y con una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón conserva su selectividad original por el receptor de glucagón en relación con los receptores de GLP-1.

[0238] La actividad del receptor de glucagón se puede reducir mediante una modificación de un aminoácido en la posición 3, por ejemplo, la sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 3, por un aminoácido ácido, básico o hidrófobo. Por ejemplo, la sustitución en la posición 3 con ácido glutámico, ornitina o norleucina reduce o destruye sustancialmente la actividad del receptor de glucagón.

[0239] La actividad mantenida o mejorada en el receptor de glucagón se puede lograr modificando la Gln en la posición 3 con un análogo de glutamina, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1243-1248, 1250, 1251 y 1253-1256.

[0240] La restauración de la actividad del glucagón que ha sido reducida por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y 2 es proporcionada por modificaciones que estabilizan la estructura de hélice alfa de la porción C-terminal (aminoácidos 12-29) del péptido relacionado con glucagón o análogo del mismo. Por ejemplo, se puede formar un puente intramolecular mediante un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos en las posiciones i e i + 4 o entre las posiciones j y j + 3, o entre las posiciones k y k + 7. En otras realizaciones, se pueden formar interacciones no covalentes tales como puentes salinos entre aminoácidos cargados positiva y negativamente en estas posiciones. En otras realizaciones más, uno o más aminoácidos α , α -disustituidos se insertan o sustituyen en esta porción C-terminal (aminoácidos 12-29) en posiciones que retienen la actividad deseada. Por ejemplo, una, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas con un aminoácido α , α -disustituido, por ejemplo, AIB.

Modificaciones que afectan la actividad de GLP-1

[0241] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal con un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster. La actividad mejorada en el receptor GLP-1 también se proporciona estabilizando la estructura de hélice alfa en la porción C-terminal del glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29), por ejemplo, mediante la formación de un puente intramolecular entre las cadenas laterales de dos aminoácidos, o sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido disustituido en α , α), como se describe adicionalmente en el presente documento. En realizaciones exemplares, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 13 y 17, 16 y 20, 17 y 21, 20 y 24 o 24 y 28 (pares de aminoácidos en los que i = 12, 16, 20 o 24) están unidos entre sí y, por lo tanto, estabilizan la hélice alfa del glucagón. En algunas realizaciones, el puente o enlazador tiene aproximadamente 8 (o aproximadamente 7-9) átomos de longitud, particularmente cuando el puente está entre las posiciones i e i + 4. En algunas realizaciones, el puente o enlazador tiene aproximadamente 6 (o aproximadamente 5-7) átomos de longitud, particularmente cuando el puente está entre las posiciones j y j + 3.

[0242] En algunas realizaciones, los puentes intramoleculares se forman (a) sustituyendo la serina natural en la posición 16 con ácido glutámico o con otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una

- longitud de 4 átomos, o alternativamente con cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico o ácido homocisteíco, o un aminoácido cargado que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, P) y una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos, y (b) sustituir la glutamina de origen natural en la posición 20 con otro aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o tiene la capacidad de formar enlaces de hidrógeno, y que tiene al menos aproximadamente 5 (o aproximadamente 4-6) átomos en longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina u ornitina. Las cadenas laterales de tales aminoácidos en las posiciones 16 y 20 pueden formar un puente salino o pueden estar unidas covalentemente. En algunas realizaciones, los dos aminoácidos se unen entre sí para formar un anillo de lactama.
- 5 [0243] En algunas realizaciones, la estabilización de la estructura de hélice alfa en la porción C-terminal del péptido relacionados con el glucagón se consigue a través de la formación de un puente intramolecular que no sea un puente de lactama. Por ejemplo, los procedimientos de enlace covalente adecuados incluyen uno o más de metátesis de olefinas, ciclación basada en lantionina, puente disulfuro o formación de puente que contiene azufre modificado, el uso de ataduras de α , α -diaminoalcano, la formación de puentes de átomos metálicos y se utilizan otros medios de ciclación de péptidos para estabilizar la hélice alfa.
- 10 En otras realizaciones adicionales, uno o más aminoácidos α , α -disustituidos se insertan o sustituyen en esta porción C-terminal (aminoácidos 12-29) en posiciones que retienen la actividad deseada. Por ejemplo, una, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas con un aminoácido α , α -disustituido, por ejemplo, AIB. La actividad aumentada en el receptor de GLP-1 es proporcionada por una modificación de aminoácido en la posición 20 como se describe en este documento. También se proporciona una mayor actividad en el receptor de GLP-1 añadiendo GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096) al C-terminal. La actividad de GLP-1 en tales análogos se puede incrementar más modificando el aminoácido en la posición 18, 28 o 29, o en la posición 18 y 29, como se describe en el presente documento. Se proporciona un aumento más modesto en la potencia de GLP-1 modificando el aminoácido en la posición 10 para que sea un residuo de aminoácido aromático grande, opcionalmente Trp. La potencia en el receptor de GLP-1 se puede mejorar aún más mediante una sustitución de alanina por la arginina nativa en la posición 18.
- 15 [0244] Se proporciona Reducción de la actividad en el receptor de GLP-1, por ejemplo, por un amino ácido modificación en la posición 7 como se describe en el presente documento.
- 20 [0245] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a un 2 glucagón péptido relacionado con la clase que aumentan GLP-1 la actividad del receptor se puede aplicar de forma individual o en combinación. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 generalmente proporcionan una mayor actividad de GLP-1 que cualquiera de tales modificaciones tomadas solas. Por ejemplo, la divulgación proporciona péptidos relacionados con glucagón que comprenden modificaciones en la posición 16, en la posición 20 y en el grupo ácido carboxílico C-terminal, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; péptidos relacionados con glucagón que comprenden modificaciones en la posición 16 y en el grupo ácido carboxílico C-terminal; péptidos relacionados con glucagón que comprenden modificaciones en las posiciones 16 y 20, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; y péptidos relacionados con glucagón que comprenden modificaciones en la posición 20 y en el grupo ácido carboxílico C-terminal.
- 25 [0246] Las modificaciones en la posición 1 y/o 2 pueden aumentar la resistencia del péptido a la escisión de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Por ejemplo, la posición 1 y/o la posición 2 pueden estar sustituidas con un aminoácido resistente a DPP-IV como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el aminoácido de la posición 2 está sustituido con N-metil alanina.
- 30 [0247] Se observó que las modificaciones en la posición 2 (por ejemplo, AIB en la posición 2) y en algunos casos las modificaciones en la posición 1 (por ejemplo, DMIA en la posición 1) pueden reducir la actividad de glucagón, a veces de manera significativa; sorprendentemente, esta reducción en la actividad del glucagón se puede restaurar estabilizando la estructura de hélice alfa en la porción C-terminal del glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29), por ejemplo, mediante la formación de un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos, como se describe en este documento. En algunas realizaciones, el enlace covalente está entre los aminoácidos en las posiciones "i" e "i + 4", o las posiciones "j" y "j + 3", por ejemplo, entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, 24 y 28, o 17 y 20. En realizaciones ejemplares, este enlace covalente es un puente de lactama entre un ácido glutámico en la posición 16 y una lisina en la posición 20. En algunas realizaciones, este enlace covalente es un puente intramolecular distinto de una lactama puente, como se describe en este documento.
- 35 Modificaciones que mejoran la resistencia a DPP-IV
- 40 [0248] En otras realizaciones adicionales a modo de ejemplo, cualquiera de los glucagón Clase 2 péptidos relacionados se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido en la posición 15 y/o 16 de la SEQ ID NO: 1001 para reducir la degradación del péptido a través del
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

- tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace peptídico Asp15-Ser16. En realizaciones ejemplares, la modificación de aminoácidos en la posición 15 es una deleción o sustitución de Asp con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteíco u ácido homocisteíco. En otras realizaciones ejemplares, la modificación de aminoácidos en la posición 16 es una deleción o sustitución de Ser por Thr o AIB. En otras realizaciones ejemplares, Ser en la posición 16 está sustituido con ácido glutámico o con otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico u ácido homocisteíco.
- [0249] En algunas realizaciones, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido nativo se modifica, por ejemplo, mediante deleción o sustitución. Tales modificaciones pueden prevenir la degradación oxidativa del péptido. En algunas realizaciones, el Met en la posición 27 está sustituido con leucina, isoleucina o norleucina. En algunas realizaciones específicas, Met en la posición 27 está sustituido con leucina o norleucina.
- [0250] En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 es modificado, por ejemplo, por deleción o sustitución. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln. En algunas realizaciones, el Gln en la posición 20 y/o 24 está sustituido con Ser, Thr, Ala o AIB. En algunas realizaciones, el Gln en la posición 20 y/o 24 está sustituido con Lys, Arg, Orn o Citrulina.
- [0251] En algunas realizaciones, el Asp en la posición 21 es modificado, por ejemplo, por deleción o sustitución. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclico seguido de isomerización a isoaspartato. En algunas realizaciones, la posición 21 está sustituida con Glu, ácido homoglutámico u ácido homocisteíco. En algunas realizaciones específicas, la posición 21 está sustituida con Glu.
- 25 Estabilización de la estructura de la hélice alfa
- [0252] La estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 (alrededor de los aminoácidos 12-29) proporciona una actividad mejorada de GLP-1 y/o GIP y restaura la actividad de glucagón que ha sido reducida por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y/o 2. La estructura de hélice alfa se puede estabilizar, por ejemplo, mediante la formación de un puente intramolecular covalente o no covalente, o la sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de hélice (por ejemplo, un aminoácido α , α -disustituido). La estabilización de la estructura de hélice alfa de un agonista de GIP se puede lograr como se describe en el presente documento.
- 35 Realizaciones de ejemplo
- [0253] De acuerdo con algunas realizaciones de la descripción, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tienen actividad agonista de GIP comprende la SEQ ID NO: 1001 con (a) un amino modificación ácido en la posición 1 que confiere DGB actividad agonista, (b) una modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa de la porción C-terminal (aminoácidos 12-29) del análogo, y (c) opcionalmente, 1 a 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) modificaciones adicionales de aminoácidos. En algunas realizaciones, el análogo muestra al menos aproximadamente un 1% de actividad de GIP nativo en el receptor de GIP o cualquier otro nivel de actividad en el receptor de GIP descrito en este documento.
- 45 [0254] En ciertas realizaciones, la modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa es uno que proporciona o introduce un puente intramolecular, incluyendo, por ejemplo, un puente intramolecular covalente, tal como cualquiera de los descritos en este documento. El puente intramolecular covalente en algunas realizaciones es un puente de lactama. El puente de lactama del análogo de estas realizaciones puede ser un puente de lactama como se describe en este documento. Véanse, por ejemplo, las enseñanzas de los puentes de lactama en la sección "Estabilización de la estructura de hélice alfa". Por ejemplo, el puente de lactama puede ser uno que esté entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$ o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones j y $j + 3$, donde i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y donde j es 17. En ciertas realizaciones, el puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, donde uno de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido con Glu y el otro de los aminoácidos de las posiciones 16 y 20 están sustituidos con Lys.
- 55 [0255] En realizaciones alternativas, la modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa es la introducción de uno, dos, tres, o cuatro α , α -amino disustituido ácidos en la posición (s) 16, 20, 21, y 24 de la analógica. En algunas realizaciones, el aminoácido α , α -disustituido es AIB. En ciertos aspectos, el aminoácido α , α -disustituido (por ejemplo, AIB) está en la posición 20 y el aminoácido en la posición 16 está sustituido con un aminoácido con carga positiva, como, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula IV, que se describe en el presente documento. El aminoácido de Fórmula IV puede ser homoLys, Lys, Orn o ácido 2,4-diaminobutírico (Dab).
- 60 [0256] Aspectos específicos en de la divulgación, la modificación de aminoácido en la posición 1 es una sustitución de Su con un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol, por ejemplo, una, aminoácido aromático grande (por ejemplo, Tyr).

[0257] En ciertos aspectos, el análogo de glucagón comprende aminoácidos modificaciones de ácido en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29. Por ejemplo, la Met en la posición 27 puede estar sustituido con un gran aminoácido alifático, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 se puede sustituir con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Ala, el Thr en la posición 29 se puede sustituir con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly, o una combinación de dos o tres de los anteriores. En realizaciones específicas, el análogo de glucagón comprende Leu en la posición 27, Ala en la posición 28 y Gly o Thr en la posición 29.

[0258] En ciertas realizaciones de la descripción, el análogo de glucagón comprende una extensión de 1 a 21 aminoácidos C-terminal para el aminoácido en la posición 29. La extensión puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1095 o 1096, por ejemplo. Adicional o alternativamente, el análogo de glucagón puede comprender una extensión de la cual 1-6 aminoácidos de la extensión son aminoácidos cargados positivamente. Los aminoácidos cargados positivamente pueden ser aminoácidos de Fórmula IV, incluidos Lys, homoLys, Orn y Dab.

[0259] El análogo del glucagón en algunas realizaciones está acilado o alquilado tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el grupo acilo o alquilo puede estar unido al análogo de glucagón, con o sin un espaciador, en la posición 10 o 40 del análogo, como se describe adicionalmente en el presente documento. El análogo puede modificarse adicional o alternativamente para comprender un resto hidrófilo como se describe adicionalmente en el presente documento. Además, en algunas realizaciones, el análogo comprende una cualquiera o una combinación de las siguientes modificaciones:

(a) Ser en la posición 2 sustituido con D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val o ácido α -amino-N-butírico;

(b) Tyr en la posición 10 sustituido con Trp, Lys, Orn, Glu, Phe o Val;

(c) Enlace de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;

(d) Lys en la posición 12 sustituida con Arg o Ile;

(e) Ser en la posición 16 sustituido con Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly o AIB;

(f) Arg en la posición 17 sustituida con Gln;

(g) Arg en la posición 18 sustituida con Ala, Ser, Thr o Gly;

(h) Gln en la posición 20 sustituida con Ser, Thr, Ala, Lys, Citrulina, Arg, Orn o AIB;

(i) Asp en la posición 21 sustituida con Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;

(j) Val en la posición 23 sustituida por Ile;

(k) Gln en la posición 24 sustituida con Asn, Ser, Thr, Ala o AIB;

(l) y una sustitución conservadora en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 8, 19, 20, 21, 24, 27, 28 y 29.

[0260] En realizaciones de ejemplo, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad agonista GIP comprende las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,

(b) un puente de lactama entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones i e i + 4 o entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones j y j + 3, donde i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y donde j es 17,

(c) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28, y

(d) 1-9 o 1-6 modificaciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos adicionales,

y la CE50 del análogo para la activación del receptor GIP es aproximadamente 10 nM o menos.

[0261] El puente de lactama del análogo de estas realizaciones puede ser un puente de lactama tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, donde uno de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido con Glu y el otro de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 está sustituido con Lys. De acuerdo con estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1005-1094.

[0262] En otros ejemplos de realización, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad agonista GIP comprende las siguientes modificaciones:

(a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,

(b) uno, dos, tres o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo se sustituye con un aminoácido α,α -disustituido,

(c) modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28, y

(d) 1-9 o 1-6 modificaciones adicionales de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones adicionales de aminoácidos,

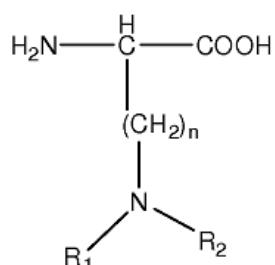
y la CE50 del análogo para la activación del receptor GIP es aproximadamente 10 nM o menos.

[0263] El aminoácido α,α disustituido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido α,α disustituido, incluido el ácido aminoisobutírico (AIB), un aminoácido disustituido con el mismo grupo o uno diferente

seleccionado de metilo, etilo, propilo y n-butilo, o con un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En determinadas realizaciones, el aminoácido α , α -disustituido es AIB. En determinadas realizaciones, el aminoácido en la posición 20 está sustituido con un aminoácido disustituido en α , α , por ejemplo, AIB. De acuerdo con estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1099-1141, 1144-1164, 1166-1169 y 1173-1178.

[0264] En aún otros ejemplos de realización, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad agonista GIP comprende las siguientes modificaciones:

- (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,
- (b) una sustitución de aminoácido de Ser en la posición 16 con un aminoácido de Fórmula IV:



[Fórmula IV],

25 en la que n es 1 a 16, o 1 a 10, o 1 a 7, o de 1 a 6, o de 2 a 6, cada uno de R₁ y R₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₁-C₁₈) OH, (alquilo C₁-C₁₈) NH₂, (alquilo C₁-C₁₈) SH, (alquilo C₀-C₄) cicloalquilo (C₃-C₆), (alquilo C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (Alquilo C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀) R₇, y (alquilo C₁-C₄) (heteroarilo C₃-C₉), donde R₇ es H u OH, y el lado La cadena del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre,

30 (c) una sustitución de aminoácidos del Gln en la posición 20 con un aminoácido alfa, alfa-disustituido,

35 (d) modificaciones de aminoácidos en uno, dos o todos los posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28, y

(e) 1-9 o 1-6 modificaciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos adicionales

40 y la CE50 del análogo para la activación del receptor GIP es aproximadamente 10 nM o menos.

[0265] El aminoácido de Fórmula IV del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido, tal como, por ejemplo, el aminoácido de fórmula IV, en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En ciertas realizaciones, n es 2, 3, 4 o 5, en cuyo caso, el aminoácido es Dab, Orn, Lys o homoLys respectivamente.

45 El aminoácido alfa, alfa disustituido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido alfa, alfa disustituido, incluido el ácido aminoisobutírico (AIB), un aminoácido disustituido con el mismo o un grupo diferente seleccionado de metilo, etilo, propilo y n-butilo, o con un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En determinadas realizaciones, el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB. De acuerdo con estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1099-1165.

50 [0267] En aún otros ejemplos de realización, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tienen actividad agonista de GIP comprende:

- (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP, y
 - (b) una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29, donde al menos uno de los aminoácidos de la extensión está acilada o alquilada,
- 55 en el que la CE50 del análogo para la activación del receptor GIP es aproximadamente 10 nM o menos.

[0268] En algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado es un aminoácido de Fórmula I, II o III. En realizaciones más específicas, el aminoácido de fórmula I es Dab, Orn, Lys u homoLys. Además, en algunas realizaciones, la extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096), donde Xes cualquier aminoácido, o GPSSGAPPK (SEQ ID NO: 1170) o XGPSSGAPPK (SEQ ID NO: 1171) o XGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1172), en la que Xes Gly o un aminoácido pequeño, alifático o no polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones, de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservadoras con respecto a SEQ ID NO: 1095, 1096, 1170, 1171 o 1172. En

algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en posición 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 del análogo extendido C-terminal. En determinadas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se localiza en la posición 40 del análogo extendido C-terminal.

- 5 [0269] En algunas realizaciones, el análogo que tiene actividad agonista de GIP comprende además amino modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas de las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, amino modificaciones de ácido en la posición 27 y/o 28.
- 10 [0270] En cualquiera de los anteriores ejemplos de realización, el amino ácido modificación en la posición 1 que confiere GIP actividad agonista puede ser una sustitución de Su con un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. La modificación del aminoácido en la posición 1 puede ser, por ejemplo, una sustitución de His por un aminoácido aromático grande. En algunas realizaciones, el aminoácido aromático grande es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluido, por ejemplo, Tyr.
- 15 [0271] Además, con respecto a lo anterior ejemplos de realización, amino modificaciones de aminoácidos en uno, dos, o todas las posiciones 27, 28, y 29 puede ser cualquiera de las modificaciones en estas posiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el Met en la posición 27 se puede sustituir con un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 se puede sustituir con un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y/o el Thr en la posición 29 se puede sustituir con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly.
- 20 Alternativamente, el análogo puede comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.
- [0272] El análogo de los anteriores ejemplos de realización pueden comprender además 1-9 o 1-6 Además, modificaciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 más modificaciones de aminoácidos, tales como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en este documento que aumentan o disminuyen la actividad en cualquiera de los receptores GIP, GLP-1 y glucagón, mejoran la solubilidad, mejoran la duración de la acción o la vida media en circulación, retrasan la aparición de acción, o aumentar la estabilidad. El análogo puede comprender además, por ejemplo, una modificación de aminoácidos en la posición 12, opcionalmente, una sustitución con Ile, y/o modificaciones de aminoácidos en las posiciones 17 y 18, opcionalmente sustitución con Q en la posición 17 y A en la posición 18, y/o una adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096), o secuencias que contienen una o más sustituciones conservadoras con respecto a SEQ ID NO: 1095 o 1096, en el extremo C-terminal. El análogo puede comprender una o más de las siguientes modificaciones:
- 25 (i) Ser en la posición 2 sustituido con D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val o ácido α -amino-N-butírico;
- 30 (ii) Tyr en la posición 10 sustituida con Trp, Lys, Orn, Glu, Phe o Val;
- 35 (iii) Enlace de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;
- (iv) Lys en la posición 12 sustituida con Arg;
- (v) Ser en la posición 16 sustituido con Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteíco, Thr, Gly o AIB;
- (vi) Arg en la posición 17 sustituida con Gln;
- 40 (vii) Arg en la posición 18 sustituida con Ala, Ser, Thr o Gly;
- (viii) Gln en la posición 20 sustituida con Ala, Ser, Thr, Lys, Citrulina, Arg, Orn o AIB;
- (ix) Asp en la posición 21 sustituida con Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteíco;
- 45 (x) Val en la posición 23 sustituida por Ile;
- (xi) Gln en la posición 24 sustituida con Asn, Ala, Ser, Thr o AIB; y
- (xii) una sustitución conservadora en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 y 29.
- 50 El análogo en algunas realizaciones comprende una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln por Glu), en donde el análogo tiene menos del 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 7 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Thr con un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile), donde el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.
- 55 [0273] Con respecto a las realizaciones exemplares, el análogo se puede unir covalentemente a un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente al resto hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40 o el extremo C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1095) y una adición de un aminoácido que comprende el resto hidrófilo, de modo que el resto hidrófilo se une covalentemente al análogo en posición 40.
- 60 [0274] En aún más realizaciones de ejemplo, el análogo del glucagón que tienen actividad agonista de GIP comprende la secuencia de aminoácidos de acuerdo con una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1227, 1228, 1229 o 1230 que comprende además las siguientes modificaciones:
- (a) opcionalmente, una modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP,
- 65 (b) una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29, donde al menos uno de los aminoácidos de la extensión está acilada o alquilada, y

(d) hasta 6 modificaciones de aminoácidos adicionales,

en el que la CE50 del análogo para la activación del receptor GIP es aproximadamente 10 nM o menos. En algunos aspectos, el aminoácido acilado o alquilado es un aminoácido de Fórmula I, II o III. En realizaciones más específicas, el aminoácido de fórmula I es Dab, Orn, Lys u homoLys. Además, en algunas realizaciones, de

5 aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096), donde Xes cualquier aminoácido, o

GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1096) NO: 1170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1171) o XGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1172), donde Xes Gly o un aminoácido pequeño, alifático o no polar o ligeramente polar. En algunas

10 realizaciones, de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservadoras con respecto a SEQ ID NO: 1095, 1096, 1170, 1171 o 1172. En

15 algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en posición 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 del análogo extendido C-terminal. En determinadas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se localiza en la posición 40 del análogo extendido C-terminal. En cualquiera de las realizaciones ejemplares anteriores, el aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP puede ser un aminoácido que carece de una

cadena lateral de imidazol.

[0275] El análogo de los anteriores ejemplos de realización pueden comprender además 1-6 más aminoácidos modificaciones de ácido, tales como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento que aumentan o disminuyen la actividad en cualquiera de los GIP, GLP-1, y receptores de glucagón, mejoran la solubilidad, mejoran la duración de la acción o la vida media en la circulación, retrasan el inicio de la acción o aumentan la estabilidad.

[0276] En ciertos aspectos, análogos de glucagón descritos en el anterior ejemplo de realización, además comprenden aminoácidos modificaciones de ácido en una, dos o todas de las posiciones 27, 28 y 29. Modificaciones

25 en estas posiciones pueden ser cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento en relación con estas posiciones. Por ejemplo, en relación con SEQ ID NO: 1227, 1228, 1229 o 1230, la posición 27 se puede sustituir con un aminoácido alifático grande (por ejemplo, Leu, Ile o norleucina) o Met, la posición 28 se puede sustituir con otro aminoácido alifático pequeño (por ejemplo, Gly o Ala) o Asn, y/o la posición 29 puede estar sustituido con otro pequeño aminoácido alifático (por ejemplo, Ala o Gly) o Thr. Alternativamente, el análogo puede

30 comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

[0277] El análogo puede comprender además una o más de las siguientes modificaciones adicionales:

(i) el aminoácido en la posición 2 es cualquiera de D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val o ácido α -amino-N-butírico;

35 (ii) el aminoácido en la posición 10 es Tyr, Trp, Lys, Orn, Glu, Phe o Val;

(iii) enlace de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;

(iv) el aminoácido en la posición 12 es Ile, Lys o Arg;

(v) el aminoácido en la posición 16 es cualquiera de Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly o AIB;

40 (vi) el aminoácido en la posición 17 es Gln o Arg;

(vii) el aminoácido en la posición 18 es cualquiera de Ala, Arg, Ser, Thr o Gly;

(viii) el aminoácido en la posición 20 es cualquiera de Ala, Ser, Thr, Lys, Citrulina, Arg, Orn o AIB u otro aminoácido alfa, alfa disustituido;

(ix) el aminoácido en la posición 21 es cualquiera de Glu, Asp, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;

45 (x) el aminoácido en la posición 23 es Val o Ile;

(xi) el aminoácido en la posición 24 es cualquiera de Gln, Asn, Ala, Ser, Thr o AIB; y

(xii) una o más sustituciones conservadoras en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 y 29.

50 [0278] El análogo en algunas realizaciones comprende una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln por Glu), en donde el análogo tiene menos del 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 7 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Thr con un aminoácido que carece de

55 un grupo hidroxilo, por ejemplo, Abu o Ile), donde el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

[0279] En lo anterior ejemplos de realización, en el que el análogo comprende un acilo o un grupo alquilo, el análogo puede estar unido a la de acilo o un grupo alquilo a través de un espaciador, tal como se describe en el presente documento. El espaciador, por ejemplo, puede tener de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un

60 aminoácido (por ejemplo, ácido 6-amino hexanoico, cualquier aminoácido descrito en este documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala, β Ala-Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, yGlu-yGlu), un tripéptido o un espaciador bifuncional hidrófobo o hidrófobo. En ciertos aspectos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14 a

65 aproximadamente 28 átomos. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos no es γ -Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es γ -Glu- γ -Glu.

[0280] En algunas realizaciones muy específicas, un análogo de la divulgación comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 1099-1141, 1144-1164, 1166, 1192-1207, 1209-1221 y 1223 o seleccionado del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1167-1169, 1173-1178 y 1225.

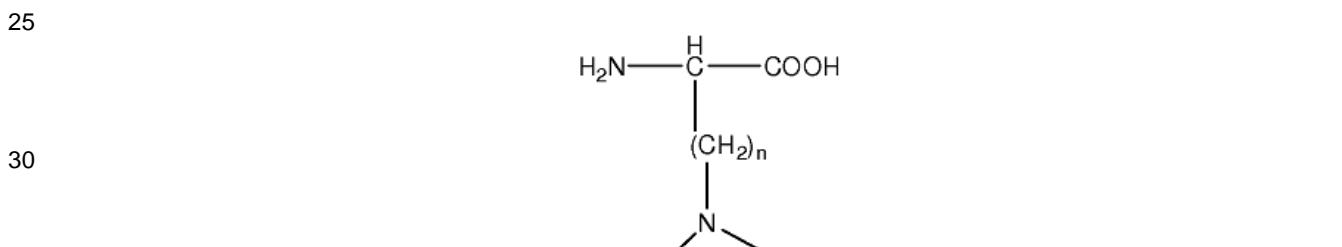
5 [0281] En aún más realizaciones de ejemplo, el análogo del glucagón que tienen actividad agonista de GIP comprende un acilo o un grupo alquilo (por ejemplo, un grupo acilo o un grupo alquilo que es no nativo a un origen natural amino ácido), en el que el acilo o un grupo alquilo está unido a un espaciador, en el que (i) el espaciador está unido a la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo; o (ii) el análogo comprende una extensión de 10 a 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29 y el espaciador está unido a la cadena lateral de un aminoácido correspondiente a una de las posiciones 37-43 con respecto a SEQ ID NO: 1001, en el que la CE50 del análogo para la activación del receptor GIP es aproximadamente 10 nM o menos.

10 [0282] En tales realizaciones, el análogo puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1001 con (i) un amino modificación ácido en la posición 1 que confiere DGB actividad agonista, (ii) amino modificaciones de ácido en uno, dos, o todas las posiciones 27, 28 y 29, (iii) al menos una de:

(A) el análogo comprende un puente de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones i e i + 4 o entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones j y j + 3, donde i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y donde j es 17;

15 (B) uno, dos, tres o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo están sustituidos con un aminoácido α , α -disustituido; o

(C) el análogo comprende (i) una sustitución de aminoácidos de Ser en la posición 16 con un aminoácido de Fórmula IV:



[Fórmula IV],

40 en la que n es de 1 a 7, en la que cada uno de R1 y R2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, Alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₁-C₁₈) OH, (alquilo C₁-C₁₈) NH₂, (alquilo C₁-C₁₈) SH, (alquilo C₀- C₄) (C₃ - C₆) cicloalquilo, (C₀-C₄ alquilo) (C₂-C₅ heterocíclico), (C₀-C₄ alquilo) (C₆-C₁₀ arilo) R₇, y (C₁-C₄ alquilo) (C₃-C₉ heteroarilo), en el que R₇ es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre; y (ii) una sustitución de aminoácidos del Gln en la posición 20 con un aminoácido alfa, alfa-disustituido, y (iv) hasta 6 modificaciones de aminoácidos adicionales.

45 [0283] La alfa, alfa-disustituido amino ácido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier alfa, alfa-disustituido amino ácido, incluyendo el ácido aminoisobutírico (AIB), un ácido amino disustituido con el mismo o un grupo diferente seleccionado de metilo, etilo, propilo y n-butilo, o con un ciclooctano o cicloheptano (por ejemplo, ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). En determinadas realizaciones, el aminoácido alfa, alfa-disustituido es AIB.

50 [0284] El aminoácido de Fórmula IV del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido, tal como, por ejemplo, el aminoácido de fórmula IV, en la que n es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o 16. En ciertas realizaciones, n es 2, 3, 4 o 5, en cuyo caso, el aminoácido es Dab, Orn, Lys o homoLys respectivamente. En cualquiera de los ejemplos de realización anteriores, la modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista de GIP puede ser una sustitución de His por un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol.

55 [0285] Además, con respecto a lo anterior ejemplos de realización, amino modificaciones de aminoácidos en uno, dos, o todas las posiciones 27, 28, y 29 puede ser cualquiera de las modificaciones en estas posiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el Met en la posición 27 se puede sustituir con un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 se puede sustituir con un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y/o el Thr en la posición 29 se puede sustituir con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly. Alternativamente, el análogo puede comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

[0286] El análogo puede comprender además, por ejemplo, un amino modificación de ácidos en la posición 12, opcionalmente, una sustitución con Ile, y/o amino modificaciones de ácido en las posiciones 17 y 18, opcionalmente sustitución con Q en la posición 17 y A en la posición 18, y/o una adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o

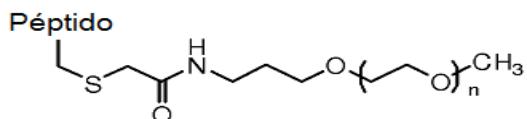
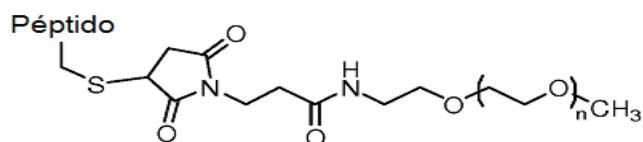
5 secuencias que contienen una o más sustituciones conservadoras con respecto a SEQ ID NO: 1095 o 1096, al extremo C-terminal. El análogo puede comprender una o más de las siguientes modificaciones:

- 10 (i) Ser en la posición 2 sustituido con D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, AIB, Val o ácido α -amino-N-butírico;
(ii) Tyr en la posición 10 sustituida con Trp, Lys, Orn, Glu, Phe o Val;
(iii) Enlace de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;
(iv) Lys en la posición 12 sustituida con Arg;
(v) Ser en la posición 16 sustituido con Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, Lys o AIB;
(vi) Arg en la posición 17 sustituida con Gln;
15 (vii) Arg en la posición 18 sustituida con Ala, Ser, Thr o Gly;
(viii) Gln en la posición 20 sustituida con Ala, Ser, Thr, Lys, Citrulina, Arg, Orn o AIB;
(ix) Asp en la posición 21 sustituida con Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;
(x) Val en la posición 23 sustituida por Ile;
(xi) Gln en la posición 24 sustituida con Asn, Ala, Ser, Thr o AIB; y
(xii) una sustitución conservadora en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24.

(xii) una sustitución conservadora en cualquiera de las posiciones 2, 3, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 y 29.
El análogo en algunas realizaciones comprende una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln por Glu), en donde el análogo tiene menos del 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácido en la posición 7 (p. Ej., Una sustitución de aminoácido de Thr con un aminoácido que carece de un grupo hidroxilo, p. Ej., Abu o Ile), una delección del aminoácido (s) C-terminal al aminoácido en la posición 27 o 28, produciendo un péptido de 27 o 28 aminoácidos, o una combinación de los mismos, en el que el análogo tiene menos de aproximadamente el 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

[0287] Con respecto a las realizaciones ejemplares, el análogo se puede unir covalentemente a un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente al resto hidrófilo en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40 o el extremo C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende una extensión C-terminal (por ejemplo, una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1095) y una adición de un aminoácido que comprende el resto hidrófilo, de modo que el resto hidrófilo se une covalentemente al análogo en posición 40.

[0288] En algunas realizaciones, el resto hidrófilo está unido covalentemente a una Lys, Cys, Orn, homocisteína, o acetil-fenilalanina de la analógica. La Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetil-fenilalanina pueden ser un aminoácido nativo de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1001) o puede ser un aminoácido que reemplaza a un aminoácido nativo de SEQ ID NO.: 1001. En algunas realizaciones, en las que el resto hidrófilo está unido a una Cys, el enlace al resto hidrófilo puede comprender la estructura



[0289] Con respecto a los análogos que comprenden un resto hidrófilo, el resto hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en este documento. Véanse, por ejemplo, las enseñanzas de la sección "Enlace de restos hidrófilos". En algunas realizaciones, el resto hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en determinadas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton, por ejemplo, de aproximadamente 20.000 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton.

[0290] En los ejemplos de realización, en el que el análogo comprende un acilo o un grupo alquilo, que está unido a la analógica a través de un espaciador, el espaciador puede ser cualquier espaciador como se describe en el

presente documento. El espaciador, por ejemplo, puede tener de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, ácido 6-amino hexanoico, cualquier aminoácido descrito en este documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala, β Ala - β Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, γ Glu- γ Glu), un tripéptido o un espaciador bifuncional hidrófilo o hidrófobo. En ciertos aspectos, la longitud total del espaciador y el grupo acilo o alquilo es de aproximadamente 14 a aproximadamente 28 átomos. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos no es γ -Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es γ -Glu- γ -Glu.

[0291] El acilo o un grupo alquilo es cualquier acilo o un grupo alquilo tal como se describe en el presente documento, tal como un grupo acilo o un grupo alquilo que es no nativo a una forma natural de aminoácidos. El grupo acilo o alquilo en algunas realizaciones es un grupo acilo graso C4 a C30, tal como, por ejemplo, un grupo alquilo o acilo graso C10, un grupo alquilo o acilo graso C12, un grupo alquilo o acilo graso C14, un grupo alquilo o acilo graso C16, un grupo acilo o alquilo, un grupo acilo o alquilo graso C18, un grupo acilo o alquilo C20, o un grupo acilo o alquilo C22, o un grupo alquilo C4 a C30. En realizaciones específicas, el grupo acilo es un grupo acilo graso C12 a C18 (por ejemplo, un grupo acilo graso C14 o C16).

[0292] En algunas realizaciones, la extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 amino ácidos C-terminal para el aminoácido en la posición 29 del análogo comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO : 1096), donde Xes cualquier aminoácido, o GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1171) o XGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1172), donde Xes Gly o un pequeño, alifático o no -aminoácido polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones, de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservadoras con respecto a SEQ ID NO: 1095, 1096, 1170, 1171 o 1172. En algunas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en posición 37, 38, 39, 40, 41, 42 o 43 del análogo extendido C-terminal. En determinadas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se localiza en la posición 40 del análogo extendido C-terminal. En determinadas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a un aminoácido que es nativo de SEQ ID NO: 1001, 1227, 1228, 1229 o 1230 o puede estar unido a un aminoácido sustituido. En determinadas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a un aminoácido que es nativo de SEQ ID NO: 1095, 1096, 1171 o 1172.

[0293] El GIP agonista puede ser un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las secuencias de aminoácidos, por ejemplo, SEQ ID NOS: 1005-1094, opcionalmente con hasta 1, 2, 3, 4, o 5 más modificaciones que retienen la actividad agonista de GIP. En determinadas realizaciones, el agonista de GIP comprende los aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1099-1262.

35 Péptidos relacionados con glucagón de clase 3

[0294] En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es una clase 3 glucagón péptido relacionado con el, que se describe en el presente documento y en la Solicitud de Patente Internacional Nº PCT/US2009/47438 (presentada el 16 de junio de 2009), Solicitud de Patente Internacional Nº WO 2008/101017, publicada el 21 de agosto de 2008, y la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/090,412 y la Solicitud de los Estados Unidos No. 61/177,476.

[0295] Algunas de las secuencias biológicas que se hace referencia en la sección siguiente (SEQ ID NOS: 89-108, 114-128 y 146-656) relativos a la clase 3 péptidos relacionados con el glucagón corresponden a SEQ ID NOS: 89-108, 114-128 y 146-656 en la Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US2009/47438.

Actividad

[0296] El péptido relacionado con glucagón de la clase 3 puede ser un péptido que exhibe una mayor actividad en el receptor de glucagón, y en realizaciones adicionales exhibe estabilidad mejorada biofísica y/o solubilidad acuosa. Además, en algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 ha perdido la selectividad del glucagón nativo por el receptor de glucagón frente al receptor de GLP-1 y, por tanto, representa coagonistas de esos dos receptores. Las modificaciones de aminoácidos seleccionadas dentro del péptido relacionado con el glucagón de Clase 3 pueden controlar la actividad relativa del péptido en el receptor de GLP-1 frente al receptor de glucagón. Por lo tanto, el péptido relacionado con glucagón de clase 3 puede ser un coagonista de glucagón/GLP-1 que tiene mayor actividad en el receptor de glucagón que en el receptor de GLP-1, un coagonista de glucagón/GLP-1 que tiene una actividad aproximadamente equivalente en ambos receptores, o un coagonista de glucagón/GLP-1 que tiene mayor actividad en el receptor de GLP-1 frente al receptor de glucagón. La última categoría de coagonistas puede diseñarse para que presente poca o ninguna actividad en el receptor de glucagón y, sin embargo, conserve la capacidad para activar el receptor de GLP-1 con la misma o mejor potencia que el GLP-1 nativo. Cualquiera de estos coagonistas también puede incluir modificaciones que confieran estabilidad biofísica mejorada y/o solubilidad acuosa.

[0297] Se pueden realizar modificaciones del péptido relacionado con glucagón de clase 3 para producir un péptido relacionado con glucagón que tenga entre al menos aproximadamente 1% (incluyendo al menos aproximadamente

1,5%, 2%, 5%, 7%, 10%, 20%),., 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%) hasta aproximadamente 200% o más de actividad en el receptor de GLP-1 en relación con el GLP-1 nativo y en cualquier lugar desde al menos alrededor del 1% (incluyendo alrededor del 1,5%, 2%, 5%, 7%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%) hasta aproximadamente 500% o más de

5 actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón nativo. La secuencia de aminoácidos del glucagón nativo es la SEQ ID NO: 701, la secuencia de aminoácidos de la amida GLP-1 (7-36) es la SEQ ID NO: 703 y la secuencia de aminoácidos del ácido GLP-1 (7-37) es la SEQ ID NO: 704.

10 [0298] El péptido relacionado con glucagón de la clase 3 puede ser un péptido relacionado con glucagón con el aumento o disminución de la actividad en el receptor de glucagón, o GLP-1 receptor, o ambos. El péptido relacionado con glucagón de clase 3 puede ser un péptido relacionado con glucagón con selectividad alterada para el receptor de glucagón frente al receptor de GLP-1. Como se describe en el presente documento, se proporcionan péptidos relacionados con glucagón de clase 3 de alta potencia que también exhiben una solubilidad y/o estabilidad mejoradas.

15 Modificaciones que afectan la actividad del glucagón

20 [0299] El aumento de actividad en el receptor de glucagón es proporcionado por un amino ácido modificación en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 701). En algunas realizaciones, el péptido relacionado con el glucagón de clase 3 es un agonista del glucagón que se ha modificado con respecto al péptido de tipo salvaje de His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr -Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 701) para mejorar la potencia del péptido en el receptor de glucagón. La serina que se encuentra normalmente en la posición 16 del glucagón nativo (SEQ ID NO: 701) se puede sustituir con aminoácidos ácidos seleccionados para mejorar la potencia del glucagón, en términos de su capacidad para estimular la síntesis de AMPc en un ensayo de modelo in vitro validado (ver Ejemplo 7). Más particularmente, esta sustitución aumenta la potencia del análogo al menos 2 veces, 4 veces, 5 veces y hasta 10 veces mayor en el receptor de glucagón. Esta sustitución también potencia la actividad del análogo en el receptor de GLP-1 al menos 5 veces, 10 veces o 15 veces con respecto al glucagón nativo, pero se mantiene la selectividad por el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1.

30 [0300] A modo de ejemplo no limitativo, tales potencia mejorada se puede proporcionar mediante la sustitución de la serina de origen natural en la posición 16 con ácido glutámico o con otro cargado negativamente amino ácido que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con una cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico o ácido homocisteíco, o un aminoácido cargado que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo (por ejemplo, N, O, S, P) y con una longitud de cadena lateral de aproximadamente 4 (o 3-5) átomos. De acuerdo con algunas realizaciones, el residuo de serina en la posición 16 del glucagón nativo está sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteíco, treonina o glicina. De acuerdo con algunas realizaciones, el residuo de serina en la posición 16 del glucagón nativo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteíco, y en algunas realizaciones el residuo de serina se sustituye con ácido glutámico..

45 [0301] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 3 de potencia mejorada comprende un péptido de SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 95 o un análogo agonista de glucagón de SEQ ID NO: 93. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un péptido relacionado con glucagón de Clase 3 que tiene una potencia mejorada en el receptor de glucagón con respecto al glucagón de tipo salvaje en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 98, en donde el péptido relacionado con glucagón retiene su selectividad por el receptor de glucagón en relación con los receptores GLP-1. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 que tiene una mayor especificidad por el receptor de glucagón comprende el péptido de SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98 o un análogo agonista de glucagón del mismo, en el que el amino carboxi terminal El ácido conserva su grupo ácido carboxílico nativo. De acuerdo con algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende la secuencia de NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu- Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-COOH (SEQ ID NO: 98), en el que el péptido muestra una potencia mejorada aproximadamente cinco veces en el receptor de glucagón, en relación con glucagón nativo medido mediante el ensayo de AMPc in vitro del Ejemplo 7.

60 [0302] La actividad del receptor de glucagón se puede reducir, mantener o potenciar mediante una modificación de un aminoácido en la posición 3, por ejemplo, la sustitución de la glutamina natural en la posición 3. En algunas realizaciones, la sustitución del aminoácido en la posición 3 por un ácido, Se ha demostrado que los aminoácidos básicos o hidrófobos (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reducen o destruyen sustancialmente la actividad del receptor de glucagón. Los análogos que están sustituidos con, por ejemplo, ácido glutámico, ornitina o norleucina tienen aproximadamente un 10% o menos de la actividad del glucagón nativo en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente un 1-10%, o aproximadamente un 0,1-10% o más. de aproximadamente el 0,1% pero menos de aproximadamente el 10%, mientras que exhibe al menos el 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor

de GLP-1. Por ejemplo, los análogos ejemplares descritos en este documento tienen aproximadamente el 0,5%, aproximadamente el 1% o aproximadamente el 7% de la actividad del glucagón nativo, mientras que exhiben al menos el 20% de la actividad del GLP-1 en el receptor GLP-1. En particular, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de Clase 3, incluidos análogos de glucagón, análogos de agonistas de glucagón, coagonistas de glucagón y moléculas coagonistas de glucagón/GLP-1, descritos en el presente documento, pueden modificarse para contener una modificación en la posición 3, p. Ej., Gln sustituido con Glu, para producir un péptido con alta selectividad, por ejemplo, diez veces selectividad, para el receptor de GLP-1 en comparación con la selectividad para el receptor de glucagón.

5 [0303] En otra realización, la glutamina de origen natural en la posición 3 de cualquiera de los 3 péptidos relacionados con el glucagón clase puede estar sustituido con un análogo de glutamina y sin una pérdida sustancial de actividad en el receptor de glucagón, y en algunos casos, con una mejora de actividad del receptor de glucagón, como se describe en este documento. En realizaciones específicas, el aminoácido de la posición 3 está sustituido con Dab (Ac). Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 601 SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604, SEQ ID NO: 605 y SEQ ID NO: 606.

10 [0304] Se observó que las modificaciones en la posición 2 (por ejemplo, AIB en la posición 2) y en algunos casos las modificaciones en la posición 1 pueden reducir la actividad de glucagón. Esta reducción en la actividad del glucagón se puede restaurar estabilizando la hélice alfa en la porción C-terminal del glucagón, por ejemplo, a través de los medios descritos en el presente documento, por ejemplo, a través de un enlace covalente entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones "i" y "i + 4", por ejemplo, 12 y 16, 16 y 20, o 20 y 24. En algunas realizaciones, este enlace covalente es un puente de lactama entre un ácido glutámico en la posición 16 y una lisina en la posición 20. En algunas realizaciones, este enlace covalente es un puente intramolecular que no es un puente lactama. Por ejemplo, los procedimientos de enlace covalente adecuados incluyen uno o más de metátesis de olefinas, ciclación basada en lantionina, puente disulfuro o formación de puente que contiene azufre modificado, el uso de ataduras de α , α -diaminoalcano, la formación de puentes de átomos metálicos y otros medios de ciclación de péptidos.

Modificaciones que afectan la actividad de GLP-1

30 [0305] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal con un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster. En algunas realizaciones, estos péptidos relacionados con glucagón de Clase 3 comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 108, en la que el aminoácido carboxi terminal tiene un grupo amida en lugar del grupo ácido carboxílico que se encuentra en el aminoácido nativo. Estos péptidos relacionados con el glucagón de clase 3 tienen una fuerte actividad en los receptores de glucagón y GLP-1 y, por tanto, actúan como coagonistas en ambos receptores. De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 es un coagonista del receptor de glucagón y GLP-1, en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 108, en donde el aminoácido en la posición 28 es Asn o Lys y el aminoácido en la posición 29 es Thr-amida.

40 [0306] El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se proporciona por modificaciones que estabilizan la hélice alfa en la porción C-terminal de glucagón (por ejemplo, alrededor de los residuos 12-29). En algunas realizaciones, tales modificaciones permiten la formación de un puente intramolecular entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que están separados por tres aminoácidos intermedios (es decir, un aminoácido en la posición "i" y un aminoácido en la posición "i + 4", donde i es cualquier número entero entre 12 y 25), por dos aminoácidos intermedios, es decir, un aminoácido en la posición "j" y un aminoácido en la posición "j + 3", donde j es cualquier número entero entre 12 y 27, o por seis aminoácidos intermedios, es decir, un aminoácido en la posición "k" y un aminoácido en la posición "k + 7", donde k es cualquier número entero entre 12 y 22. En realizaciones ejemplares, el puente o enlazador es aproximadamente 8 (o alrededor de 7-9) átomos de longitud y se forma entre las cadenas laterales de aminoácidos en las posiciones 12 y 16, o en las posiciones 16 y 20, o en las posiciones 20 y 24, o en las posiciones 24 y 28. El lado de dos aminoácidos las cadenas se pueden unir entre sí a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes.

55 [0307] De acuerdo con algunas realizaciones, la clase 3 glucagón péptido relacionado con exposiciones de glucagón/GLP-1 receptor co-agonista de la actividad y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 99, 101, 102 y 103. En algunas realizaciones, las cadenas laterales se unen covalentemente entre sí, y en algunas realizaciones los dos aminoácidos se unen entre sí para formar un anillo de lactama.

60 [0308] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende un glucagón análogo de péptido relacionado de SEQ ID NO: 108, donde el péptido comprende un puente de lactama intramolecular formado entre las posiciones de aminoácidos 12 y 16 o entre las posiciones de aminoácidos 16 y 20. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 108, en la que se forma un puente de lactama intramolecular entre las posiciones de aminoácidos 12 y 16, entre las posiciones

de aminoácidos 16 y 20, o entre las posiciones de aminoácidos 20. y 24 y el aminoácido en la posición 29 es glicina, en donde la secuencia de SEQ ID NO: 29 está unida al aminoácido C-terminal de SEQ ID NO: 108. En una realización adicional, el aminoácido en la posición 28 es aspártico ácido.

5 [0309] En algunas realizaciones específicas, la estabilización de la estructura de hélice alfa en la porción C-terminal del péptido relacionadas con la clase 3 glucagón se consigue a través de la formación de un puente intramolecular que no sea un puente de lactama. Por ejemplo, los procedimientos de enlace covalente adecuados incluyen uno o más de metátesis de olefinas, ciclación basada en lantionina, puente disulfuro o formación de puente que contiene azufre modificado, el uso de ataduras de α , α -diaminoalcano, la formación de puentes de átomos metálicos y se utilizan otros medios de ciclación de péptidos para estabilizar la hélice alfa.

10 [0310] Por otra parte, el aumento de la actividad en el receptor de GLP-1 se puede conseguir mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la porción C-terminal del péptido relacionado con glucagón (alrededor de los aminoácidos 12-29) mediante la introducción intencionada de uno o más α , aminoácidos α -disustituidos en posiciones que retienen la actividad deseada. Dichos péptidos pueden considerarse en el presente documento como un péptido que carece de un puente intramolecular. En algunos aspectos, la estabilización de la hélice alfa se logra de esta manera sin la introducción de un puente intramolecular tal como un puente salino o un enlace covalente. En algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 de un péptido relacionado con glucagón se sustituye con un aminoácido α , α -disustituido. Por ejemplo, la sustitución de la posición 20 16 del péptido relacionado con glucagón de Clase 3 por ácido aminoisobutírico (AIB) potencia la actividad de GLP-1, en ausencia de un puente salino o lactama. En algunas realizaciones, una, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas por AIB.

15 [0311] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 se puede conseguir mediante un amino ácido modificación en la posición 20. En algunas realizaciones, la glutamina en la posición 20 se sustituye con otro aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está ya sea cargada o tiene una capacidad para formar enlaces de hidrógeno, y tiene al menos aproximadamente 5 (o aproximadamente 4-6) átomos de longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina u ornitina.

20 [0312] El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se demuestra en péptidos relacionados 3 glucagón Clase que comprenden la extensión C-terminal de la SEQ ID NO: 78. GLP-1 actividad en tales péptidos relacionados 3 glucagón clase comprende la SEQ ID NO: 78 puede aumentarse adicionalmente modificando el aminoácido en la posición 18, 28 o 29, o en la posición 18 y 29, como se describe en el presente documento. Se puede lograr un aumento más modesto en la potencia de GLP-1 modificando el aminoácido en la posición 10 para que sea Trp.

25 [0313] Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 pueden proporcionar una mayor actividad de GLP-1 que cualquiera de estas modificaciones tomadas solas. Por ejemplo, los péptidos relacionados con el glucagón de Clase 3 pueden comprender modificaciones en la posición 16, en la posición 20 y en el grupo ácido carboxílico C-terminal, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; puede comprender modificaciones en la posición 16 y en el grupo ácido carboxílico C-terminal; puede comprender modificaciones en las posiciones 16 y 20, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; o puede comprender modificaciones en la posición 20 y en el grupo ácido carboxílico C-terminal; opcionalmente con la condición de que el aminoácido en la posición 12 no sea Arg; u opcionalmente con la condición de que el aminoácido de la posición 9 no sea Glu.

30 45 Modificaciones que afectan la solubilidad

Adición de restos hidrófilos

50 [0314] Los péptidos relacionados con glucagón de la clase 3 se pueden modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad y la estabilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras que conserva la actividad biológica alta en relación con el glucagón nativo. Los restos hidrófilos como se discute en este documento se pueden unir al péptido relacionado con glucagón de Clase 3 como se discute más en este documento. De acuerdo con algunas realizaciones, se prevé que la introducción de grupos hidrófilos en las posiciones 17, 21 y 24 del péptido relacionado con glucagón de clase 3 que comprende la SEQ ID NO: 97 o la SEQ ID NO: 98 mejore la solubilidad y estabilidad del glucagón de alta potencia. análogo en soluciones que tienen un pH fisiológico. La introducción de tales grupos también aumenta la duración de la acción, por ejemplo, medida por una vida media prolongada en la circulación.

55 60 65 [0315] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con la Clase 3 glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107, en donde la cadena lateral de un residuo de aminoácido en una de las posiciones 16, 17, 21 o 24 de dicha Clase 3 El péptido relacionado con glucagón comprende además una cadena de polietienglicol, que tiene un peso molecular seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Dalton. En algunas realizaciones, la cadena de

polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Dalton. En otra forma de realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Dalton. En otras realizaciones ejemplares más, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Dalton. De acuerdo con algunas realizaciones, el grupo hidrófilo comprende una cadena de polietilenglicol (PEG). Más particularmente, en algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 94 o SEQ ID NO: 95 donde una cadena de PEG está unida covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos presentes en las posiciones 21 y 24 de la El péptido relacionado con glucagón de clase 3 y el aminoácido carboxi terminal del péptido relacionado con glucagón de clase 3 tienen el grupo ácido carboxílico. De acuerdo con algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Dalton.

[0316] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado pegilado 3 glucagón Clase comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unido covalentemente a la 3 glucagón Clase péptido relacionado con el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones, el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido que consiste en SEQ ID NO: 93 o un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID NO: 93, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton.

20 Extremo C-terminal cargado

[0317] La solubilidad del péptido relacionado con 3 glucagón clase que comprende la SEQ ID NO: 20 se puede mejorar más, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más cargada amino ácido (s) a la porción C-terminal de glucagón relacionados péptido de SEQ ID NO: 108, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. Dicho aminoácido cargado se puede introducir sustituyendo un aminoácido nativo con un aminoácido cargado, por ejemplo, en las posiciones 28 o 29, o alternativamente agregando un aminoácido cargado, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En realizaciones ejemplares, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. Pueden realizarse modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservadoras, en el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 que aún le permiten retener la actividad del glucagón. En algunas realizaciones, se proporciona un análogo del péptido relacionado con glucagón de Clase 3 de la SEQ ID NO: 108 en el que el análogo difiere de la SEQ ID NO: 108 por 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en las posiciones 17-26 y, en algunas realizaciones, el análogo se diferencia del péptido de SEQ ID NO: 108 por una sustitución de aminoácidos en la posición 20.

35 Acilación/Alquilación

[0318] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón se modifica para comprender un acilo o un grupo alquilo, por ejemplo, un C4 a C30 acilo o un grupo alquilo. En algunas realizaciones, la divulgación proporciona un péptido relacionado con glucagón de Clase 3 modificado para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo unido covalentemente al aminoácido en la posición 10 del péptido relacionado con glucagón. El péptido relacionado con glucagón puede comprender además un espaciador entre el aminoácido en la posición 10 del péptido relacionado con glucagón de Clase 3 y el grupo acilo o grupo alquilo. Cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de Clase 3 anteriores puede comprender dos grupos acilo o dos grupos alquilo, o una combinación de los mismos. En un aspecto específico de la divulgación, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 acilado comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 534-544 y 546-549.

Truncamiento del extremo terminal C

50 [0319] En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de Clase 3 descritos en este documento se modifican adicionalmente mediante el truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos del extremo C-terminal del péptido de glucagón (es decir, posición 29 y/o 28) sin afectar la actividad, y/o potencia en los receptores de glucagón y GLP-1. A este respecto, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 puede comprender los aminoácidos 1-27 o 1-28 del péptido de glucagón nativo (SEQ ID NO: 1), opcionalmente con una o más modificaciones descritas en el presente documento. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 truncado comprende SEQ ID NO: 550 o SEQ ID NO: 551. En otra realización, el péptido agonista de glucagón truncado comprende SEQ ID NO: 552 o SEQ ID NO: 553.

Extensión del extremo C-terminal

60 [0320] De acuerdo con algunas realizaciones, los péptidos relacionados Clase 3 glucagón descritos en este documento están modificados por la adición de un segundo péptido al extremo carboxi del péptido relacionado con glucagón, por ejemplo, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 118. En algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de Clase 3 que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ

ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111 y SEQ ID NO: 69 está unido covalentemente a través de un enlace peptídico a un segundo péptido, en el que el segundo péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118. En una sección adicional En una realización, en péptidos relacionados con glucagón de Clase 3 que comprenden la extensión C-terminal, la treonina en la posición 29 del péptido relacionado con glucagón nativo se reemplaza con una glicina. Un péptido relacionado con glucagón de clase 3 que tiene una sustitución de treonina por glicina en la posición 29 y que comprende la extensión carboxí terminal de SEQ ID NO: 78 es cuatro veces más potente en el receptor GLP-1 que el glucagón nativo modificado para comprender la extensión carboxí terminal de SEQ ID NO: 78. La potencia en el receptor de GLP-1 puede mejorarse aún más mediante una sustitución de alanina por la arginina nativa en la posición 18.

[0321] Por consiguiente, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 puede tener una extensión carboxí terminal de SEQ ID NO: 117 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 118. De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 que comprende SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 108, comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 118 unida al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón. Más particularmente, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 118 unida al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón. Más particularmente, el péptido relacionado con glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 120 más que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 79 unida al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón de Clase 3. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 121.

[0322] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente con respecto a la clase 3 de glucagón péptidos relacionados que la actividad del receptor de glucagón disminución aumento o y que aumentan GLP-1 la actividad del receptor se puede aplicar de forma individual o en combinación. Las modificaciones ejemplares incluyen, pero no se limitan a:

(A) Mejorar la solubilidad, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más aminoácidos cargados en la porción C-terminal del glucagón nativo, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. Dicho aminoácido cargado puede introducirse sustituyendo un aminoácido nativo con un aminoácido cargado, por ejemplo, en las posiciones 28 o 29, o alternativamente añadiendo un aminoácido cargado, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En realizaciones ejemplares, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados positivamente. Tales modificaciones aumentan la solubilidad, por ejemplo, proporcionan al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o más solubilidad con respecto al glucagón nativo a un pH dado entre aproximadamente 5,5 y 8, p., pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25 ° C.

(B) Aumentar la solubilidad y la duración de la acción o la semivida en circulación mediante la adición de un resto hidrófilo, como una cadena de polietilenglicol, como se describe en el presente documento, por ejemplo, en la posición 16, 17, 20, 21, 24 o 29, o en la Aminoácido C-terminal del péptido.

(C) Aumento de la estabilidad mediante modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, mediante delección o sustitución con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteíco o ácido homocisteíco. Tales modificaciones pueden reducir la degradación o escisión a un pH dentro del rango de 5,5 a 8, especialmente en tampones ácidos o alcalinos, por ejemplo, reteniendo al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98 % o 99% del péptido original después de 24 horas a 25 ° C.

(D) Aumento de la estabilidad mediante la modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, mediante sustitución con leucina o norleucina. Tales modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa. La estabilidad también puede aumentarse mediante la modificación de Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, mediante sustitución con Ser, Thr, Ala o AIB. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln. La estabilidad se puede incrementar mediante la modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, mediante sustitución con Glu. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclico seguido de isomerización a isoaspartato.

(E) Aumento de la resistencia a la escisión de la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) mediante la modificación del aminoácido en la posición 1 o 2 con los aminoácidos resistentes a la DPP-IV descritos en este documento e incluyendo la modificación del aminoácido en la posición 2 con N-metilanina.

(F) Sustituciones, adiciones o delecciones conservadoras o no conservadoras que no afectan la actividad, por ejemplo, sustituciones conservadoras en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29; delecciones en una o más de las posiciones 27, 28 o 29; o una delección del aminoácido 29 combinado opcionalmente con una amida o éster C-terminal en lugar del grupo ácido carboxílico C-terminal;

(G) Agregar extensiones de terminal C como se describe en este documento;

(H) Incrementar la semivida en circulación y/o extender la duración de la acción y/o retrasar el inicio de la acción, por ejemplo, a través de la acilación o alquilación del péptido relacionado con glucagón, como se describe en el presente

documento;

(I) Homodimerización o heterodimerización como se describe en este documento.

[0323] Otras modificaciones incluyen la sustitución de His en la posición 1 con un aminoácido grande, aromático (por ejemplo, Tyr, Phe, Trp o amino-Phe); Ser en la posición 2 con Ala; sustitución de Tyr en la posición 10 por Val o Phe; sustitución de Lys en la posición 12 por Arg; sustitución de Asp en la posición 15 por Glu; sustitución de Ser en la posición 16 por Thr o AIB.

[0324] Los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 con actividad de GLP-1 que contienen una sustitución no conservadora de His en la posición 1 con un aminoácido aromático grande (por ejemplo, Tyr) pueden retener la actividad de GLP-1 siempre que la hélice alfa sea estabilizado mediante un puente intramolecular, por ejemplo, como cualquiera de los descritos en este documento.

Conjugados y fusiones

[0325] El péptido relacionado con glucagón de la clase 3 puede estar unido, opcionalmente a través de un enlace covalente y opcionalmente a través de un enlazador, a un resto conjugado. El péptido relacionado con glucagón de Clase 3 también puede ser parte de un péptido o proteína de fusión en el que un segundo péptido o polipéptido se ha fusionado a un extremo, por ejemplo, el extremo carboxi del péptido relacionado con glucagón de Clase 3. Más particularmente, el péptido relacionado con el glucagón de clase 3 de fusión puede comprender un agonista de glucagón de SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 98 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 117 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 118 (KRNRR) unidas al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 117 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 118 (KRNRR) está unida al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón de Clase 3 a través de un enlace peptídico. Los solicitantes han descubierto que en péptidos de fusión de péptidos relacionados con glucagón de Clase 3 que comprenden el péptido de extensión C-terminal de Exendina-4 (p. Ej., SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79), sustitución del residuo de treonina nativo en la posición 29 con glicina aumenta drásticamente la actividad del receptor de GLP-1. Esta sustitución de aminoácidos puede usarse junto con otras modificaciones descritas en este documento con respecto a péptidos relacionados con glucagón de Clase 3 para mejorar la afinidad de los análogos de glucagón por el receptor de GLP-1. Por ejemplo, la sustitución de T29G se puede combinar con las sustituciones de aminoácidos S16E y N20K, opcionalmente con un puente de lactama entre los aminoácidos 16 y 20, y opcionalmente con la adición de una cadena de PEG como se describe en este documento.

[0326] En algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de la Clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 121. En algunas realizaciones, el 3 porción de péptido relacionado con glucagón Clase del péptido de fusión de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92 y SEQ ID NO: 93 en donde una cadena PEG, cuando está presente en las posiciones 17, 21, 24, o el aminoácido C-terminal, o tanto en 21 como en 24, se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Dalton. Más particularmente, en algunas realizaciones, el segmento de péptido relacionado con glucagón de Clase 3 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96 y SEQ ID NO: 122, en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 500 a 5.000. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 es un péptido de fusión que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72 y SEQ ID NO: 80 donde el péptido de SEQ ID NO: 80 está unido al extremo carboxi de SEQ ID NO: 72.

[0327] De acuerdo con algunas realizaciones, una modificación química adicional del péptido relacionado con glucagón de Clase 3 de SEQ ID NO: 98 otorga una potencia aumentada del receptor de GLP-1 hasta un punto en el que la actividad relativa en los receptores de glucagón y GLP-1 es virtualmente equivalente. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende un aminoácido terminal que comprende un grupo amida en lugar del grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido nativo. La actividad relativa del péptido relacionado con el glucagón de Clase 3 en los respectivos receptores de glucagón y GLP-1 se puede ajustar mediante modificaciones adicionales del péptido relacionado con el glucagón de Clase 3 para producir análogos que demuestren aproximadamente un 40% a aproximadamente un 500% o más de la actividad de glucagón en el receptor de glucagón y aproximadamente del 20% a aproximadamente el 200% o más de la actividad del GLP-1 nativo en el receptor de GLP-1, por ejemplo, un aumento de 50, 100 veces o más en relación con la actividad normal del glucagón en el Receptor de GLP-1.

Realizaciones de ejemplo

[0328] De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, en donde dicho difiere analógicas de SEQ ID NO: 72 con 1 a 3 amino ácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28 y 29, en donde dicho péptido relacionado con glucagón exhibe al menos el 20% de la actividad del GLP-1 nativo en el GLP. -1 receptor.

[0329] De acuerdo con al

gunas realizaciones se proporciona un glucagón/GLP-1 receptor co-agonista comprende la secuencia:

- NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys- Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO: 81) donde se selecciona el Xaa en la posición 15 del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, el Xaa en la posición 20 es Gln o Lys, el Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, el Xaa en la posición 28 es Asn, Lys o un aminoácido ácido, el Xaa en la posición 29 es Thr, Gly o un aminoácido ácido, y Res COOH o CONH₂, con la condición de que cuando la posición 16 es serina, la posición 20 es Lys o, alternativamente, cuando la posición 16 es serina, la posición 24 es Glu y la posición 20 o la posición 28 es Lys. En algunas realizaciones, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81 en la que el aminoácido en la posición 28 es ácido aspártico y el aminoácido en la posición 29 es ácido glutámico. En otra realización, el aminoácido en la posición 28 es la asparagina nativa, el aminoácido en la posición 29 es glicina y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 está unida covalentemente al extremo carboxi de SEQ ID NO: 81.
- [0330] En algunas realizaciones se proporciona un co-agonista comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81 en el que un aminoácido ácido adicional añadido al extremo carboxi del péptido. En una realización adicional, el aminoácido carboxi terminal del análogo de glucagón tiene una amida en lugar del grupo ácido carboxílico del aminoácido natural. En algunas realizaciones, el análogo de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 88.
- [0331] De acuerdo con algunas realizaciones un relacionados con el glucagón análogo de péptido de SEQ ID NO: se presentó 81, en donde dicho difiere analógicas de SEQ ID NO: 81 con 1 a 3 amino ácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21 y 27, con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 16 es serina, la posición 20 es lisina o se forma un puente de lactama entre el aminoácido en la posición 24 y el aminoácido en la posición 20 o en la posición 28. De acuerdo con algunas realizaciones, el análogo se diferencia de la SEQ ID NO: 81 en 1 a 3 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 21 y 27. En algunas realizaciones el análogo del péptido glucagón de SEQ ID NO: 81 difiere de esa secuencia en 1 a 2 aminoácidos, o en algunas realizaciones por un solo aminoácido, seleccionado de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21 y 27, con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 16 es serina, la posición 20 es lisina, o se forma un puente de lactama entre la amin o ácido en la posición 24 y el aminoácido en la posición 20 o en la posición 28.
- [0332] De acuerdo con otra realización, se proporciona un relativamente selectivo GLP-1 agonista del receptor que comprende la secuencia NH₂-His-Ser-Xaa-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu -Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO: 83) donde el Xaa en la posición 3 se selecciona del grupo de aminoácidos que consisten en Glu, Orn o Nle, el Xaa en la posición 15 se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de amino ácidos que consisten en Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, el Xaa en la posición 20 es Gln o Lys, el Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, el Xaa en la posición 28 es Asn, Lys o un aminoácido ácido, el Xaa en la posición 29 es Thr, Gly o un aminoácido ácido, y Res COOH, SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79, con la condición de que cuando la posición 16 es serina, la posición 20 es Lys, o alternativamente cuando la posición 16 es s erine la posición 24 es Glu y la posición 20 o la posición 28 es Lys. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 3 es ácido glutámico. En algunas realizaciones, el aminoácido ácido sustituido en la posición 28 y/o 29 es ácido aspártico o ácido glutámico.
- [0333] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón, incluyendo un péptido co-agonista, comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81 que comprende además un aminoácido ácido adicional añadido al extremo carboxi del péptido. En una realización adicional, el aminoácido carboxi terminal del análogo de glucagón tiene una amida en lugar del grupo ácido carboxílico del aminoácido natural.
- [0334] De acuerdo con algunas realizaciones se proporciona un glucagón/GLP-1 receptor co-agonista que comprende un péptido relacionados con el glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en: NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser -Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO: 81), en el que Xaa en la posición 15 se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, el Xaa en la posición 20 es Gln o Lys, el Xaa en la posición 24 es Gln o Glu y el Xaa en la posición 28 es Asn, Asp o Lys, Res COOH o CONH₂, el Xaa en la posición 29 es Thr o Gly, y Res COOH, CONH₂, SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79, con la condición de que cuando la posición 16 es serina, la posición 20 es Lys, o alternativamente cuando la posición 16 es serina, la posición 24 es Glu y posición 20 o posición el ion 28 es Lys. En algunas realizaciones, Res CONH₂, el Xaa en la posición 15 es Asp, el Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, los Xaa en las posiciones 20 y 24 son cada uno Gln el Xaa en la posición 28 es Asn o Asp y el Xaa en la posición 29 es Thr. En algunas realizaciones, los Xaas en las posiciones 15 y 16 son cada uno Glu, los Xaas en las posiciones 20 y 24 son cada uno Gln, el Xaa en la posición 28 es Asn o Asp, el Xaa en la posición 29 es Thr y Res CONH₂.

[0335] Se ha informado de que ciertas posiciones de la péptido similar al glucagón nativo pueden ser modificados al tiempo que conserva al menos parte de la actividad del péptido parental. En consecuencia, los solicitantes anticipan que uno o más de los aminoácidos ubicados en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 del péptido de SEQ ID NO: 99 puede sustituirse con un aminoácido diferente del presente en el péptido de glucagón nativo y aún retener actividad en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido nativo se cambia a leucina o norleucina para prevenir la degradación oxidativa del péptido. En otra realización, el aminoácido en la posición 20 está sustituido con Lys, Arg, Orn o Citrullene y/o la posición 21 está sustituida con Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteíco.

[0336] En algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: se presentó 108 que de 1 a 6 aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 27, 28 o 29 del análogo difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 701, con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 16 es serina, la posición 20 es Lys, o alternativamente cuando la posición 16 es serina, la posición 24 es Glu y la posición 20 o la posición 28 es Lys. De acuerdo con otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 108 en el que de 1 a 3 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 27, 28 o 29 del análogo difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 701. En otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97 o SEQ ID NO: 99 donde 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20 o 21 del análogo difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 701, y en una realización adicional, uno a dos aminoácidos diferentes representan sustituciones de aminoácidos conservativas con respecto al aminoácido presente en la secuencia de glucagón nativa (SEQ ID NO: 701). En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de glucagón de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 en el que el péptido de glucagón comprende además una, dos o tres sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 27 o 29. En algunas realizaciones, las sustituciones en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 27 o 29 son sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[0337] De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 que comprende una variante de la secuencia de SEQ ID NO 81, en la que de 1 a 10 aminoácidos seleccionados de las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29, respectivamente, de la variante difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 701. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 81 en la que la variante difiere de SEQ ID NO: 81 por una o más sustituciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en Gln17, Ala18, Glu21, Ile23, Ala24, Val27 y Gly29. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 que comprende variantes de la secuencia de SEQ ID NO 81, en la que 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-26 de la variante difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO: 701. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 81 en la que la variante difiere de SEQ ID NO: 81 por una sustitución de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en Gln17, Ala18, Glu21, Ile23 y Ala24. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 81 en la que la variante difiere de la SEQ ID NO: 81 por una sustitución de aminoácido en la posición 18 en la que el aminoácido sustituido se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ser, Thr y Gly. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 81 en la que la variante difiere de SEQ ID NO: 81 por una sustitución de aminoácidos de Ala en la posición 18. Dichas variaciones están englobadas por SEQ ID NO: 72. En otra realización se proporciona un coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 que comprende variantes de la secuencia de SEQ ID NO 81, en la que de 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-22 de la variante difieren del aminoácido correspondiente de SEQ ID NO : 701, y en una realización adicional se proporciona una variante de SEQ ID NO 81 en la que la variante difiere de SEQ ID NO: 81 por 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en las posiciones 20 y 21.

[0338] De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 que comprende la secuencia: NH2-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys- Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Xaa-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R(SEQ ID NO: 123), en donde el Xaa en la posición 15 es Asp, Glu, ácido cisteíco, ácido homoglutámico u ácido homocisteíco, el Xaa en la posición 16 es Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteíco, el Xaa en la posición 20 es Gln, Lys, Arg, Orn o citrulina, el Xaa en la posición 21 es Asp, Glu, ácido homoglutámico u ácido homocisteíco, el Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, el Xaa en la posición 28 es Asn, Lys o un aminoácido ácido, el Xaa en la posición 29 es Thr o un aminoácido ácido y Res COOH o CONH₂. En algunas realizaciones, Res CONH₂. De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 que comprende una variante de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115 o SEQ ID NO: 116, en donde la variante se diferencia de dicha secuencia por una sustitución de aminoácidos en la posición 20. En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácidos se selecciona del grupo que consiste en Lys, Arg, Orn o citrulina para la posición 20.

[0339] En algunas realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 82 en el que los difiere analógicas de SEQ ID NO: 82 por tener un amino ácido distinto de serina en la posición 2. En algunas realizaciones, el residuo de serina es sustituido con ácido aminoisobutírico, D-alanina y, en algunas realizaciones, el residuo de serina está sustituido con ácido aminoisobutírico. Tales modificaciones

- suprimen la escisión por la dipeptidil peptidasa IV mientras retienen la potencia inherente del compuesto original (por ejemplo, al menos 75, 80, 85, 90, 95% o más de la potencia del compuesto original). En algunas realizaciones, la solubilidad del análogo aumenta, por ejemplo, al introducir uno, dos, tres o más aminoácidos cargados en la porción C-terminal del glucagón nativo, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. En realizaciones ejemplares, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otra realización, el análogo comprende además un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido nativo en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 82.
- [0340] En algunas realizaciones, los análogos de glucagón presente documento se divultan además modificado en la posición 1 o 2 para reducir la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. En algunas realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón de SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103 en donde el análogo difiere del molécula parental mediante una sustitución en la posición 2 y muestra una susceptibilidad reducida (es decir, resistencia) a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, ácido amino n-butírico, glicina, N-metilserina y ácido aminoisobutírico. En algunas realizaciones, la posición 2 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, glicina, N-metil serina y ácido aminoisobutírico. En otra realización, la posición 2 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, glicina, N-metil serina y ácido aminoisobutírico. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 2 no es D-serina. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 127 o SEQ ID NO: 128.
- [0341] En algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102 o la SEQ ID NO: se proporciona 103 donde el análogo se diferencia de la molécula original por una sustitución en la posición 1 y exhibe una susceptibilidad reducida (es decir, resistencia) a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, la posición 1 del péptido análogo está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, ácido alfa, alfa-dimetilimidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. En otra realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de SEQ ID NO: 82 en el que el análogo difiere de SEQ ID NO: 82 por tener un aminoácido distinto de histidina en la posición 1. En algunas realizaciones, la solubilidad del análogo aumenta., por ejemplo, introduciendo uno, dos, tres o más aminoácidos cargados en la parte C-terminal del glucagón nativo, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. En realizaciones ejemplares, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otra realización, el análogo comprende además un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido nativo en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi terminal del péptido de SEQ ID NO: 82. En algunas realizaciones, el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico.
- [0342] En algunas realizaciones, el glucagón/GLP-1 del receptor de co-agonista comprende una secuencia de SEQ ID NO: 108 que comprende además una extensión carboxi terminal adicional de un amino ácido o un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118. En la realización en la que se añade un único aminoácido al terminal carboxi de SEQ ID NO: 108, el aminoácido se selecciona típicamente de uno de los 20 aminoácidos comunes, y en algunas realizaciones, el aminoácido carboxi terminal adicional tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. En algunas realizaciones, el aminoácido adicional se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico y glicina.
- [0343] En una alternativa se proporciona realización, una de glucagón/GLP-1 receptor co-agonista en el que los comprende péptidos al menos un anillo de lactama formada entre la cadena lateral de un residuo de ácido glutámico y un residuo de lisina, en el que el residuo de ácido glutámico y una Los residuos de lisina están separados por tres aminoácidos. En algunas realizaciones, el aminoácido carboxi terminal de la lactama que lleva el péptido de glucagón tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. Más particularmente, en algunas realizaciones se proporciona un coagonista de glucagón y GLP-1 que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en:

5 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu- Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 109)

10 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu- Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 110)

15 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser- Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 111)

20 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser- Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Xaa-R (SEQ ID NO: 112)

25 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu- Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Asn-Thr-R (SEQ ID NO: 104)

30 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu- Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 105)

35 NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe- Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu- Arg-Arg-Ala-Lys-Asp-Phe-Val-Glu-Trp-Leu- Met-Lys-Thr-R (SEQ ID NO: 106)

40 donde Xaa en la posición 28 = Asp o Asn, Xaa en la posición 29 es Thr o Gly, Rse selecciona del grupo que consiste en COOH, CONH₂, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118, y se forma un puente de lactama entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 para SEQ ID NO: 109, entre Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 para SEQ ID NO: 110, entre Lys en la posición 20 y Glu en la posición 24 para SEQ ID NO: 111, entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para SEQ ID NO: 112, entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 y entre Lys en la posición 20 y Glu en la posición 24 para SEQ ID NO: 104, entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 y entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para SEQ ID NO: 105 y entre Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 an d entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para SEQ ID NO: 106. En algunas realizaciones, Rse selecciona del grupo que consiste en COOH, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, el aminoácido en la posición 28 es Asn, y el el aminoácido en la posición 29 es treonina. En algunas realizaciones, Res el aminoácido en la posición 28 es Asn y el aminoácido en la posición 29 es treonina. En otra realización, Rse selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 y SEQ ID NO: 80 y el aminoácido en la posición 29 es glicina.

45 [0344] En una realización adicional, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106, donde el péptido comprende además una extensión carboxi terminal adicional de un aminoácido o un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118. En algunas realizaciones, la extensión terminal comprende la secuencia de SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 y el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72. En algunas realizaciones, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 81 en la que el aminoácido en la posición 16 es ácido glutámico, el aminoácido en la posición 20 es lisina, el aminoácido en la posición 28 está asparagina y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 está unida al extremo carboxi terminal de SEQ ID NO: 81.

50 [0345] En la realización en la que un único aminoácido se añade al extremo carboxi terminal de la SEQ ID NO: 108, el aminoácido se selecciona típicamente de uno de los 20 aminoácidos comunes, y en algunas realizaciones el aminoácido tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido nativo. En algunas realizaciones, el aminoácido adicional se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico y ácido aspártico y glicina. En las realizaciones en las que el análogo agonista de glucagón comprende además una extensión carboxi terminal, el aminoácido carboxi terminal de la extensión, en algunas realizaciones, termina en un grupo amida o un grupo éster en lugar de un ácido carboxílico.

- [0346] En otra realización, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia: NH₂-His-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr-Xaa-CONH₂ (SEQ ID NO: 107), donde Xaa en la posición 30 representa cualquier aminoácido. En algunas 5 realizaciones, Xaa se selecciona de uno de los 20 aminoácidos comunes, y en algunas realizaciones el aminoácido es ácido glutámico, ácido aspártico o glicina. La solubilidad de este péptido se puede mejorar aún más uniendo covalentemente una cadena de PEG a la cadena lateral del aminoácido en la posición 17, 21, 24 o 30 de SEQ ID NO: 107. En una realización adicional, el péptido comprende una extensión carboxi terminal adicional, de un péptido 10 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 y SEQ ID NO: 118. De acuerdo con algunas realizaciones, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130 y SEQ ID NO: 131.
- [0347] Modificaciones específicas de sitio adicionales internas a la secuencia de glucagón de SEQ ID NO: 99, SEQ 15 ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107 y SEQ ID NO: 121 se pueden preparar para producir un conjunto de agonistas de glucagón que poseen grados variables de agonismo de GLP-1. Por consiguiente, se han preparado y caracterizado péptidos que poseen una potencia *in vitro* prácticamente idéntica en cada receptor. De manera similar, se han identificado y caracterizado péptidos con una potencia diez veces mejorada selectivamente en cada uno de los dos receptores. Como se indicó anteriormente, la sustitución del residuo de serina en la posición 16 con ácido glutámico aumenta la 20 potencia del glucagón nativo en los receptores de glucagón y GLP-1, pero mantiene aproximadamente una selectividad diez veces mayor por el receptor de glucagón. Además, al sustituir la glutamina nativa en la posición 3 con ácido glutámico (SEQ ID NO: 128) se genera un análogo de glucagón que muestra una selectividad aproximadamente diez veces mayor por el receptor de GLP-1.
- [0348] La solubilidad de los péptidos coagonistas de glucagón/GLP-1 se puede mejorar aún más en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras se conserva la alta actividad biológica en relación con el glucagón nativo mediante la introducción de grupos hidrófilos en las posiciones 16, 17, 21, y 24 del péptido, o mediante la adición de un único aminoácido modificado (es decir, un aminoácido modificado para comprender un grupo hidrófilo) en el extremo carboxi del péptido coagonista glucagón/GLP-1. De acuerdo con algunas realizaciones, el grupo hidrófilo 25 comprende una cadena de polietileno (PEG). Más particularmente, en algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 106 en donde una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, 29 o el aminoácido C-terminal de el péptido de glucagón, con la condición de que cuando el péptido comprende SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ 30 ID NO: 100 o SEQ ID NO: 101 la cadena de polietilenglicol se une covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 17, 21 o 24, cuando el péptido comprende SEQ ID NO: 102 o SEQ ID NO: 103, la cadena de polietilenglicol está unida covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 17 o 21, y cuando el péptido comprende SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 o SEQ ID NO: 106, la cadena de polietilenglicol está unida covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 17 o 21.
- [0349] En algunas realizaciones, el péptido similar al glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 100 o la SEQ ID NO: 101, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 21, 24, o el aminoácido C-terminal del péptido glucagón, y el aminoácido carboxi terminal del péptido tiene un grupo amida en lugar del grupo ácido carboxílico del aminoácido nativo. En algunas 40 realizaciones, el péptido coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106 y SEQ ID NO: 107, donde una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 21 o 24 de SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101 y SEQ ID NO: 107, o en la posición 16, 17 o 21 de SEQ ID NO: 102 y SEQ ID NO: 103 o en la posición 17 o 21 de SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105 y SEQ ID NO: 106 del péptido de glucagón. En otra realización, el péptido coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 99 o SEQ ID NO: 107, en la que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 21, o 24 o el aminoácido C-terminal del péptido glucagón.
- [0350] En algunas realizaciones, un péptido similar al glucagón selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, y SEQ ID NO: 107 se modifica adicionalmente para comprender una cadena de PEG unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17 o 21 del péptido de glucagón. En algunas realizaciones, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 pegilado comprende además la secuencia de SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 117 o SEQ ID NO: 79.
- [0351] En otra realización, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 120, que comprende además una extensión C-terminal de SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79 o SEQ ID NO: 80 unido al aminoácido C-terminal de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 120, y que opcionalmente comprende además una 65 cadena de PEG unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 18, 21, 24 o 29 o el

aminoácido C-terminal del péptido. En otra realización, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72 o SEQ ID NO: 120, en la que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 21 o 24 del péptido relacionado con glucagón y el El péptido comprende además una extensión C-terminal de SEQ ID NO: 78, o SEQ ID NO: 79.

- 5 [0352] En otra realización, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 72, o SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 82, en el que un aminoácido adicional se añade al extremo carboxi de la SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 82, y una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral del aminoácido añadido. En una realización adicional, el análogo de glucagón pegilado comprende además una extensión C-terminal de SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 unida al aminoácido C-terminal de SEQ ID NO: 81 o SEQ ID NO: 82. En En otra realización, el péptido relacionado con glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 107, en la que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 30 del péptido relacionado con glucagón y el péptido comprende además una extensión C-terminal de SEQ ID NO: 78 o SEQ ID NO: 79 enlazadas al aminoácido C-terminal de SEQ ID NO: 107.
- 10 [0353] La cadena de polietilenglicol puede estar en forma de cadena lineal o puede ser ramificada. De acuerdo con algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Dalton. En algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado en el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton. En una realización alternativa, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado en el intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Dalton. De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón pegilado comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unidas covalentemente al péptido relacionado con glucagón en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton. En algunas realizaciones, el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido que consiste en SEQ ID NO: 93 o un análogo de agonista de glucagón de SEQ ID NO: 93, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo de aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en el que el peso molecular combinado de las dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Dalton.
- 15 [0354] En ciertas realizaciones ejemplares, el péptido similar al glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 701 con hasta diez amino modificaciones de ácido y comprende un aminoácido en la posición 10 que está acilado o alquilado. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 10 se acila o alquila con un ácido graso C4 a C30. En ciertos aspectos, el aminoácido en la posición 10 comprende un grupo acilo o un grupo alquilo que no es nativo de un aminoácido de origen natural.
- 20 [0355] En determinadas realizaciones, el péptido de glucagón que comprende un aminoácido en la posición 10 que está acilado o alquilado comprende una hélice alfa estabilizada. Por consiguiente, en ciertos aspectos, el péptido de glucagón comprende un grupo acilo o alquilo como se describe en este documento y un puente intramolecular, por ejemplo, un puente intramolecular covalente (por ejemplo, un puente de lactama) entre las cadenas laterales de un aminoácido en la posición i y un amino ácido en la posición i + 4, donde i es 12, 16, 20 o 24. Alternativa o adicionalmente, el péptido de glucagón comprende un grupo acilo o alquilo como se describe en el presente documento y una, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 y/o 24 del péptido de glucagón están sustituidos con un aminoácido α, α-disustituido, por ejemplo, AIB. En algunos casos, el péptido de glucagón no nativo comprende Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20, donde opcionalmente un puente de lactama une el Glu y el Lys y, opcionalmente, el péptido de glucagón comprende además una o más modificaciones seleccionadas del grupo. que consiste en: Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, Glu en la posición 21, Ile en la posición 23 y Ala en la posición 24.
- 25 [0356] Además, en cualquiera de las realizaciones, en el que el péptido relacionado con glucagón comprende un aminoácido en la posición 10 que está acilado o alquilado, el péptido relacionado con glucagón puede comprender, además, una amida C-terminal en lugar del carboxilato alfa C-terminal.
- 30 [0357] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón que comprende un acilo o un grupo alquilo como se describe en el presente documento comprende además una sustitución de aminoácidos en la posición 1, en la posición 2, o en las posiciones 1 y 2, en el que la sustitución de aminoácidos (s) lograr Resistencia a la proteasa DPP-IV. En determinadas realizaciones específicas, el péptido relacionado con glucagón es uno que comprende la SEQ ID N°: 72 con un aminoácido en la posición 10 acilado o alquilado como se describe en el presente documento. El grupo acilo o alquilo de estas realizaciones puede ser cualquier grupo acilo o alquilo descrito en el presente documento. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser un grupo acilo graso C4 a C30 (por ejemplo, C8 a C24) y el grupo alquilo puede ser un grupo alquilo C4 a C30 (por ejemplo, C8 a C24).
- 35 [0358] El aminoácido al que está unido el acilo o un grupo alquilo puede ser cualquiera de los aminoácidos descritos en este documento, por ejemplo, un aminoácido de cualquiera de Fórmula I (por ejemplo, Lys), fórmula II, y la Fórmula III.

[0359] En algunas realizaciones, el grupo acilo o un grupo alquilo está unido directamente al aminoácido en la posición 10. En algunas realizaciones, el acilo o un grupo alquilo está unido al aminoácido en la posición 10 a través de un espaciador, tal como, por ejemplo, un espaciador que tiene de 3 a 10 átomos de longitud, por ejemplo, un aminoácido o dipéptido. En este documento se describen espaciadores adecuados con el fin de unir un grupo acilo o alquilo.

[0360] En ciertos aspectos, los análogos de glucagón comprenden al menos una modificación de aminoácidos y hasta 15 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 modificaciones de aminoácidos) o hasta 10 modificaciones de aminoácidos. En determinadas realizaciones, los análogos que comprenden al menos una modificación de aminoácidos y hasta 10 modificaciones de aminoácidos representan modificaciones conservadoras de aminoácidos. En este documento se describen modificaciones conservadoras de aminoácidos.

[0361] Por consiguiente, en algunos aspectos, el análogo de glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 701 con uno o más de: Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, Glu en la posición 21, Ile en la posición 23, y Ala o Cys en la posición 24, o sustituciones conservadoras de aminoácidos de las mismas. En algunos aspectos, el análogo comprende una amida C-terminal en lugar del alfa carboxilato C-terminal. En determinadas realizaciones, el análogo comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 1, la posición 2 o las posiciones 1 y 2, sustituciones que consiguen resistencia a la proteasa DPP-IV. Las sustituciones de aminoácidos adecuadas se describen en este documento. Por ejemplo, DMIA en la posición 1 y/o d-Ser o AIB en la posición 2. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 2 no es D-serina.

[0362] Adicionalmente o alternativamente, el análogo puede comprender uno o una combinación de: (a) Ser en la posición 2 sustituido con Ala; (b) Gln en la posición 3 sustituida con Glu o un análogo de glutamina; (c) Thr en la posición 7 sustituida por Ile; (d) Tyr en la posición 10 sustituida con Trp o un aminoácido que comprende un grupo acilo o alquilo que no es nativo de un aminoácido de origen natural; (e) Lys en la posición 12 sustituida por Ile; (f) Asp en la posición 15 sustituida con Glu; (g) Ser en la posición 16 sustituido con Glu; (h) Gln en la posición 20 sustituida con Ser, Thr, Ala, AIB; (i) Gln en la posición 24 sustituida con Ser, Thr, Ala, AIB; (j) Met en la posición 27 sustituido con Leu o Nle; (k) Asn en la posición 29 sustituido con un aminoácido cargado, opcionalmente Asp o Glu; y (l) Thr en la posición 29 sustituida con Gly o un aminoácido cargado, opcionalmente Asp o Glu. En ciertos aspectos, el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 657-669.

[0363] Con respecto a los análogos que exhiben actividad agonista en el receptor GIP, el análogo comprende una extensión de 1-21 amino ácidos (por ejemplo, 5-19, 7-15, 9-12 aminoácidos). La extensión del análogo puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que la extensión sea de 1 a 21 aminoácidos. En algunos aspectos, la extensión es de 7 a 15 aminoácidos y en otros aspectos, la extensión es de 9 a 12 aminoácidos. En algunas realizaciones, la extensión comprende (i) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o 674, (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene una alta identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 80%, 85%, 90%, 95%, %, 98%, 99%) con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 78 o 674, o (iii) la secuencia de aminoácidos de (i) o (ii) con una o más modificaciones conservadoras de aminoácidos.

[0364] En algunas realizaciones, al menos uno de los aminoácidos de la extensión está acilado o alquilado. El aminoácido que comprende el grupo acilo o alquilo puede estar ubicado en cualquier posición de extensión del análogo. En determinadas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado de la extensión se localiza en una de las posiciones 37, 38, 39, 40, 41 o 42 (según la numeración de SEQ ID NO: 701) del análogo. En determinadas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se localiza en la posición 40 del análogo.

[0365] En realizaciones de ejemplo, el acilo o un grupo alquilo es un grupo acilo o un grupo alquilo que es no nativo a un origen natural amino ácido. Por ejemplo, el grupo acilo o alquilo puede ser un grupo acilo graso C4 a C30 (por ejemplo, C12 a C18) o alquilo C4 a C30 (por ejemplo, C12 a C18). El grupo acilo o alquilo puede ser cualquiera de los discutidos en este documento.

[0366] En algunas realizaciones, el acilo o un grupo alquilo está unido directamente al aminoácido, por ejemplo, a través de la cadena lateral del aminoácido. En otras realizaciones, el grupo acilo o alquilo se une al aminoácido mediante un espaciador (por ejemplo, un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un espaciador bifuncional hidrófilo, un espaciador bifuncional hidrófobo). En ciertos aspectos, el espaciador tiene de 3 a 10 átomos de longitud. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos no es γ -Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es γ -Glu- γ -Glu.

[0367] Además, en ejemplos de realización, el aminoácido al que está unido el acilo o un grupo alquilo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, un aminoácido de fórmula I, II, o III. El aminoácido que se acila o alquila puede ser una Lys, por ejemplo. Los aminoácidos adecuados que comprenden un grupo acilo o alquilo, así como grupos acilo y grupos alquilo adecuados, se describen en este documento. Véanse, por ejemplo, las enseñanzas de las secciones tituladas Acilación y Alquilación.

- [0368] En otras realizaciones, 1-6 amino ácidos (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 de amino ácidos) de la extensión son positivos cargado amino ácidos, por ejemplo, amino ácidos de Fórmula IV, como, por ejemplo, Lys. Como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido con carga positiva" se refiere a cualquier aminoácido, natural o no natural, que comprende una carga positiva en un átomo de su cadena lateral a un pH fisiológico. En ciertos aspectos, los aminoácidos con carga positiva se ubican en cualquiera de las posiciones 37, 38, 39, 40, 41, 42 y 43. En realizaciones específicas, un aminoácido con carga positiva se ubica en la posición 40. En otros casos, la extensión se acila o alquila como se describe en el presente documento y comprende 1-6 aminoácidos cargados positivamente como se describe en el presente documento.
- 5 [0369] En otras realizaciones, los análogos que exhiben actividad agonista en los comprende los receptores de GIP (i) SEQ ID NO: 701 con al menos un amino modificación de los ácidos, (ii) una extensión de 1 a 21 amino ácidos (por ejemplo, 5 a 18, 7 a 15, 9 a 12 aminoácidos) C-terminal al aminoácido en la posición 29 del análogo, y (iii) un aminoácido que comprende un grupo acilo o alquilo que no es nativo de un aminoácido que se encuentra fuera de la extensión C-terminal (por ejemplo, en cualquiera de las posiciones 1-29). En algunas realizaciones, el análogo comprende un aminoácido acilado o alquilado en la posición 10. En aspectos particulares, el grupo acilo o alquilo es un acilo graso C4 a C30 o un grupo alquilo C4 a C30. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo se une mediante un espaciador, por ejemplo, un aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrófilo, espaciador bifuncional hidrófobo). En ciertos aspectos, el análogo comprende una modificación de aminoácidos que estabiliza la hélice alfa, como un puente de sal entre un Glu en la posición 16 y un Lys en la posición 20, o un aminoácido alfa, alfa disustituido en cualquiera, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 y 24. En aspectos específicos, el análogo comprende además modificaciones de aminoácidos que confieren resistencia a la proteasa DPP-IV, por ejemplo, DMIA en la posición 1, AIB en la posición 2. Análogos que comprenden más aminoácidos Las modificaciones ácidas se contemplan en la presente. En una realización, el péptido relacionado con el glucagón de Clase 3 comprende las estructuras de cualquiera de las SEQ ID NO: 657-669.
- 10 [0370] De acuerdo con algunas realizaciones, el péptido relacionado con la Clase 3 glucagón comprende la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo (SEQ ID NO: 701) que comprende las siguientes modificaciones: AIB en la posición 2, Glu en la posición 3, Lys en la posición 10, Glu en la posición 16, Gln en la posición 17, Ala en la posición 18, Lys en la posición 20, Glu en la posición 21, Ile en la posición 23, Ala en la posición 24; donde Lys en la posición 10 está acilada con un ácido graso C14 o C16, y donde el carboxilato C-terminal se reemplaza con una amida. En una realización específica, este péptido relacionado con glucagón de Clase 3 se une a través de su aminoácido N-terminal al dipéptido D-Lys-Sarcosina.
- 15 [0371] De acuerdo con algunas realizaciones, la clase 3 glucagón péptido relacionado comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 514, 517 a 534, o 554, opcionalmente con hasta 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones adicionales que retienen la actividad agonista de GLP-1 y/o agonista de glucagón. En determinadas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 comprende los aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 562-684 y 1701-1776. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con el glucagón de Clase 3 comprende las secuencias de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 1801-1908.
- 20 [0372] Los conjugados de incretina-péptido de insulina descritos se cree que son adecuados para cualquier uso que se ha descrito anteriormente para los péptidos de insulina o para los péptidos relacionados con el glucagón, incluyendo el uso para reducir el peso o prevenir la ganancia de peso. Por consiguiente, los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento se pueden usar para tratar la hiperglucemia o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles altos de glucosa en sangre. Por consiguiente, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de incretina-insulina como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de un paciente que padece niveles elevados de glucosa en sangre. De acuerdo con una realización, el paciente que se va a tratar usando un conjugado de incretina-insulina descrito en este documento es un animal domesticado y, en otra realización, el paciente que se va a tratar es un ser humano.
- 25 [0373] La presente descripción se refiere a la del conjugado descrito actualmente incretina-insulina para uso en un procedimiento de tratamiento de la hiperglucemia en conformidad con la presente divulgación que comprende las etapas de administrar la actualmente descrito incretina-insulina conjugado a un paciente usando cualquier ruta estándar de administración, que incluye parenteralmente, tal como por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y el conjugado de incretina-insulina se envasa previamente en una jeringa.
- 30 [0374] El conjugado de la incretina-insulina da a conocer en el presente documento puede administrarse solo o en combinación con otros agentes anti-diabéticos. Los agentes antidiabéticos conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen insulina nativa, glucagón nativo y análogos funcionales de los mismos, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirida (Amaryl) o gliclazida (Diamicron); meglitinidas,
- 35 [0375] Los conjugados de incretina-insulina descritos se cree que son adecuados para cualquier uso que se ha descrito anteriormente para los péptidos de insulina o para los péptidos relacionados con el glucagón, incluyendo el uso para reducir el peso o prevenir la ganancia de peso. Por consiguiente, los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento se pueden usar para tratar la hiperglucemia o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles altos de glucosa en sangre. Por consiguiente, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de incretina-insulina como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de un paciente que padece niveles elevados de glucosa en sangre. De acuerdo con una realización, el paciente que se va a tratar usando un conjugado de incretina-insulina descrito en este documento es un animal domesticado y, en otra realización, el paciente que se va a tratar es un ser humano.
- 40 [0376] La presente descripción se refiere a la del conjugado descrito actualmente incretina-insulina para uso en un procedimiento de tratamiento de la hiperglucemia en conformidad con la presente divulgación que comprende las etapas de administrar la actualmente descrito incretina-insulina conjugado a un paciente usando cualquier ruta estándar de administración, que incluye parenteralmente, tal como por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y el conjugado de incretina-insulina se envasa previamente en una jeringa.
- 45 [0377] Los conjugados de incretina-insulina descritos se cree que son adecuados para cualquier uso que se ha descrito anteriormente para los péptidos de insulina o para los péptidos relacionados con el glucagón, incluyendo el uso para reducir el peso o prevenir la ganancia de peso. Por consiguiente, los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento se pueden usar para tratar la hiperglucemia o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles altos de glucosa en sangre. Por consiguiente, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de incretina-insulina como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de un paciente que padece niveles elevados de glucosa en sangre. De acuerdo con una realización, el paciente que se va a tratar usando un conjugado de incretina-insulina descrito en este documento es un animal domesticado y, en otra realización, el paciente que se va a tratar es un ser humano.
- 50 [0378] La presente descripción se refiere a la del conjugado descrito actualmente incretina-insulina para uso en un procedimiento de tratamiento de la hiperglucemia en conformidad con la presente divulgación que comprende las etapas de administrar la actualmente descrito incretina-insulina conjugado a un paciente usando cualquier ruta estándar de administración, que incluye parenteralmente, tal como por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y el conjugado de incretina-insulina se envasa previamente en una jeringa.
- 55 [0379] Los conjugados de incretina-insulina descritos se cree que son adecuados para cualquier uso que se ha descrito anteriormente para los péptidos de insulina o para los péptidos relacionados con el glucagón, incluyendo el uso para reducir el peso o prevenir la ganancia de peso. Por consiguiente, los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento se pueden usar para tratar la hiperglucemia o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles altos de glucosa en sangre. Por consiguiente, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de incretina-insulina como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de un paciente que padece niveles elevados de glucosa en sangre. De acuerdo con una realización, el paciente que se va a tratar usando un conjugado de incretina-insulina descrito en este documento es un animal domesticado y, en otra realización, el paciente que se va a tratar es un ser humano.
- 60 [0380] La presente descripción se refiere a la del conjugado descrito actualmente incretina-insulina para uso en un procedimiento de tratamiento de la hiperglucemia en conformidad con la presente divulgación que comprende las etapas de administrar la actualmente descrito incretina-insulina conjugado a un paciente usando cualquier ruta estándar de administración, que incluye parenteralmente, tal como por vía intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular, intratecal, transdérmica, rectal, oral, nasal o por inhalación. En una realización, la composición se administra por vía subcutánea o intramuscular. En una realización, la composición se administra por vía parenteral y el conjugado de incretina-insulina se envasa previamente en una jeringa.
- 65 [0381] Los conjugados de incretina-insulina descritos se cree que son adecuados para cualquier uso que se ha descrito anteriormente para los péptidos de insulina o para los péptidos relacionados con el glucagón, incluyendo el uso para reducir el peso o prevenir la ganancia de peso. Por consiguiente, los conjugados de incretina-insulina descritos en este documento se pueden usar para tratar la hiperglucemia o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles altos de glucosa en sangre. Por consiguiente, la divulgación abarca composiciones farmacéuticas que comprenden un conjugado de incretina-insulina como se describe en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en el tratamiento de un paciente que padece niveles elevados de glucosa en sangre. De acuerdo con una realización, el paciente que se va a tratar usando un conjugado de incretina-insulina descrito en este documento es un animal domesticado y, en otra realización, el paciente que se va a tratar es un ser humano.

como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidinedionas como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos) o troglitazona (Rezulin) u otros inhibidores de PPAR γ ; inhibidores de la alfa glucosidasa que inhiben la digestión de carbohidratos, como miglitol (Glyset), acarbose (Precose/Glucobay); exenatida (Byetta) o pramlintida; Inhibidores de la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) tales como vildagliptina o sitagliptina; Inhibidores de SGLT (transportador de glucosa dependiente de sodio 1); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

[0375] Las composiciones farmacéuticas que comprenden los conjugados de la incretina-insulina descritas en este documento se pueden formular y administrar a los pacientes que utilizan portadores y vías de administración conocidos por los expertos en la técnica farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, la presente divulgación también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más de los conjugados de incretina-insulina descritos en el presente documento o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización, la composición farmacéutica comprende una concentración de 1 mg/ml del conjugado de incretina-insulina a un pH de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 7,0 en un sistema tampón de fosfato. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender el conjugado de incretina-insulina como único componente farmacéuticamente activo, o el péptido conjugado de incretina-insulina puede combinarse con uno o más agentes activos adicionales.

[0376] Todos los procedimientos terapéuticos, composiciones farmacéuticas, kits y otras realizaciones similares descritas en el presente documento contemplan que los péptidos conjugados de la incretina-insulina incluyen todas las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

[0377] En una realización, el kit está provisto de un dispositivo para administrar el conjugado de incretina-insulina a un paciente. El kit puede incluir además una variedad de recipientes, por ejemplo, viales, tubos, botellas. Preferiblemente, los kits también incluirán instrucciones de uso. De acuerdo con una realización, el dispositivo del kit es un dispositivo dispensador de aerosol, en el que la composición está preenvasada dentro del dispositivo de aerosol. En otra realización, el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización, la composición de conjugado de incretina-insulina está preenvasada dentro de la jeringa.

[0378] Los compuestos tal como se describen en el presente documento se pueden preparar por procedimientos estándar de síntesis, las técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro procedimiento de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no pueden expresarse mediante técnicas estándar de ADN recombinante, las técnicas para su preparación son conocidas en la técnica. Los compuestos descritos en el presente documento que abarcan porciones no peptídicas pueden sintetizarse mediante reacciones de química orgánica estándar, además de reacciones de química de péptidos estándar cuando sea aplicable.

[0379] Cualquiera de las modificaciones en el péptido péptido o insulina incretina como se describió anteriormente que aumentan o disminuyen la incretina o actividad del receptor de la insulina pueden aplicarse individualmente o en combinación. Además, cada uno de los espaciadores de cadena lineal descritos en este documento puede usarse en combinación con cualquier incretina o insulina para formar increlinas de acuerdo con la presente descripción. Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente también se puede combinar con otras modificaciones que confieran otras propiedades deseables, tales como mayor solubilidad y/o estabilidad y/o duración de la acción.

EJEMPLO 1

Síntesis de cadenas A y B de insulina

[0380] Las cadenas de insulina A y B se sintetizaron en 4-methylbenzhydryl amina (MBHA) de resina o resina de 4-hidroximetil-fenilacetamidometilo (PAM) utilizando la química de Boc. Los péptidos se escindieron de la resina usando HF/p-cresol 95: 5 durante 1 hora a 0°C. Después de la eliminación del HF y la precipitación con éter, los péptidos se disolvieron en ácido acético acuoso al 50% y se liofilizaron. Alternativamente, los péptidos se sintetizaron usando química Fmoc. Los péptidos se escindieron de la resina usando ácido trifluoroacético (TFA)/Triisopropilsilano (TIS)/H₂O (95: 2,5: 2,5), durante 2 horas a temperatura ambiente. El péptido se precipitó mediante la adición de una cantidad excesiva de éter dietílico y el sedimento se solubilizó en tampón ácido acuoso. La calidad de los péptidos se controló mediante RP-HPLC se confirmó mediante espectrometría de masas (ESI o MALDI).

[0381] cadenas de insulina A se sintetizaron con una única cisteína libre en el aminoácido 7 y todas las otras cisteínas protegidas como acetamidometilo A- (SH)⁷ (AcM)^{6,11,20}. Las cadenas de insulina B se sintetizaron con una sola cisteína libre en la posición 7 y la otra cisteína protegida como acetamidometil B- (SH)⁷ (Acm)¹⁹. Los péptidos brutos se purificaron mediante RP-HPLCconvencional.

[0382] Las cadenas sintetizadas A y B estaban vinculados el uno al otro a través de su enlace de puente de disulfuro nativo, como se describe previamente en US-2011 a 0.257.076. La cadena B respectiva se activó al derivado de Cys⁷- Npys mediante disolución en DMF o DMSO y se hizo reaccionar con 2,2'-Ditriobis (5-nitropiridina) (Npys) en una

relación molar 1: 1, a temperatura ambiente. La activación se controló mediante RP-HPLC y el producto se confirmó mediante ESI-MS.

[0383] El primer enlace disulfuro B7-A7 se formó por disolución de la respectiva (SH) A-⁷ (Acm)^{6,11,20} B- (Npys) y⁷ (Acm)¹⁹ en relación 1: 1 molar a una concentración total de péptidos de 10 mg/ml. Cuando se completó la reacción de combinación en cadena, la mezcla se diluyó hasta una concentración de ácido acético acuoso al 50%. Los dos últimos enlaces disulfuro se formaron simultáneamente mediante la adición de yodo. Se añadió a la solución un exceso molar de 40 veces de yodo y la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora más. La reacción se terminó mediante la adición de una solución acuosa de ácido ascórbico. La mezcla se purificó mediante RP-HPLC y el compuesto final se confirmó mediante MALDI-MS. Como se muestra en los datos de la Tabla 1, la insulina sintética preparada de acuerdo con este procedimiento se compara bien con la insulina purificada para la unión al receptor de insulina.

[0384] Los péptidos de insulina que comprende un modificado amino ácido (tal como 4-amino fenilalanina en la posición A19) también se pueden sintetizar *in vivo* usando un sistema que permite la incorporación de no codificado amino ácidos en las proteínas, incluyendo, por ejemplo, el sistema enseñado en las patentes estadounidenses números 7.045.337 y 7.083.970.

20 Tabla 1: Actividad de la insulina sintetizada en relación con la insulina nativa

	Patrón de insulina		Insulina A7-B7	
	PROM.	DESV. EST.	PROM.	DESV. EST.
IC ₅₀ (nM)	0,24	0,07	0,13	0,08
% de actividad de insulina	100		176,9	

EJEMPLO 2

25 Pegilación de grupos amina (N-terminal y lisina) mediante alquilación reductora

a. Síntesis

[0385] Se disolvieron insulina (o un análogo de insulina), mPEG20k-alidhído y NaBH₃ CN, en una relación molar de 1: 2: 30, en tampón de ácido acético a un pH de 4,1-4,4. La solución de reacción se compone de 0,1 N de NaCl, 0,2 de ácido acético N y 0,1 N Na₂CO₃. La concentración de péptido de insulina fue de aproximadamente 0,5 mg/ml. La reacción ocurre durante seis horas a temperatura ambiente. El grado de reacción se controló mediante RP-HPLC y el rendimiento de la reacción fue aproximadamente del 50%.

b. Purificación

[0386] La mezcla de reacción se diluyó 25 veces con 0,1% de TFA y se aplicó a una columna preparativa RP-HPLC. Condición de HPLC: columna C4; caudal 10 ml/min; Un tampón ACN al 10% y TFA al 0,1% en agua; Tampón B TFA al 0,1% en ACN; Un gradiente lineal B% de 0-40% (0-80 min); Se eluyó PEG-insulina o análogos a aproximadamente un 35% de tampón B. Los compuestos deseados se verificaron mediante MALDI-TOF, después de la modificación química mediante sulfólisis o degradación de tripsina.

Pegilación de grupos amina (N-terminal y lisina) mediante acilación con N-hidroxisuccinimida.

a. Síntesis

[0387] La insulina (o un análogo de insulina), junto con mPEG20k-NHS se disolvieron en 0,1 N bicina tampón (pH 8,0) a una relación molar de 1: 1. La concentración de péptido de insulina fue de aproximadamente 0,5 mg/ml. El progreso de la reacción se controló mediante HPLC. El rendimiento de la reacción es aproximadamente del 90% después de 2 horas a temperatura ambiente.

b. Purificación

[0388] La mezcla de reacción se diluyó 25 veces y se carga a RP-HPLC. Condición de HPLC: columna C4; caudal 10 ml/min; Un tampón ACN al 10% y TFA al 0,1% en agua; Tampón B TFA al 0,1% en ACN; Un gradiente lineal B% de 0-40% (0-80 min); Se recogió PEG-insulina o análogos a aproximadamente 35% de B. Los compuestos deseados se verificaron mediante MAIDI-TOF, después de la modificación química mediante sulfólisis o degradación de tripsina.

Pegilación aminada reductora del grupo acetilo en el anillo aromático de la fenilalanina

a. Síntesis

[0389] Se disolvieron insulina (o un análogo de insulina), mPEG20k-hidrazida y NaBH₃ CN en una relación molar de 1: 2: 20 en tampón de ácido acético (pH de 4,1 a 4,4). La solución de reacción se compone de 0,1 N de NaCl, 0,2 de ácido acético N y 0,1 N Na₂ CO₃. La concentración de insulina o análogos de insulina fue de aproximadamente 0,5 mg/ml. a temperatura ambiente durante 24 h. El proceso de reacción se controló mediante HPLC. La conversión de la reacción fue aproximadamente del 50%. (calculado por HPLC)

10 b. Purificación

[0390] La mezcla de reacción se diluyó 25 veces y se carga a RP-HPLC.

Condición de HPLC: columna C4; caudal 10 ml/min; Un tampón ACN al 10% y TFA al 0,1% en agua; Tampón B TFA al 0,1% en ACN; Un gradiente lineal B% de 0-40% (0-80 min); Se recogió PEG-insulina, o el análogo de PEG-insulina a aproximadamente 35% de B. Los compuestos deseados se verificaron mediante MALDI-TOF, después de la modificación química mediante sulftolisis o degradación de tripsina.

EJEMPLO 3

20 Protocolo de síntesis general de incretina:

[0391] Los análogos de glucagón se sintetizaron usando un solo acoplamiento "Fast Boc" activado por HBTU a partir de 0,2 mmol de resina Boc Thr (OBzl) Pam en un sintetizador de péptidos Applied Biosystem 430 A modificado. Los aminoácidos Boc y HBTU se obtuvieron de Midwest Biotech (Fishers, IN). Los grupos protectores de la cadena lateral utilizados fueron: Arg (Tos), Asn (Xan), Asp (OcHex), Cys (pMeBzl), His (Bom), Lys (2Cl-Z), Ser (OBzl), Thr (OBzl), Tyr (2Br-Z) y Trp (CHO). El grupo protector de la cadena lateral en el His N-terminal era Boc.

[0392] Cada resina de peptidilo completa se trató con una solución de piperidina al 20% en dimetilformamida para eliminar el grupo formilo del triptófano. Las escisiones de fluoruro de hidrógeno líquido se realizaron en presencia de p-cresol y sulfuro de dimetilo. La escisión se realizó durante 1 hora en un baño de hielo usando un aparato de HF (Penninsula Labs). Después de la evaporación del HF, el residuo se suspendió en éter dietílico y los materiales sólidos se filtraron. Cada péptido se extrajo en 30-70 ml de ácido acético acuoso y una alícuota diluida se analizó por HPLC[Beckman System Gold, 0.46x5cm Zorbax C8, 1ml/min, 45C, 214nm, A buffer = 0.1% TFA, 0.1% TFA/90% acetonitrilo, gradiente de 10% a 80% B durante 10 min],

[0393] La purificación se realizó en un FPLC sobre una columna Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm mientras se controlaba el UV a 214 nm y se recogían fracciones de 5 minutos. Las fracciones homogéneas se combinaron y liofilizaron para dar un producto de pureza > 95%. La masa molecular y la pureza correctas se confirmaron usando análisis espectral de masas MALDI.

40 EJEMPLO 4

Protocolo general de pegilación de incretinas: (Cys-maleimido)

[0394] Típicamente, el glucagón Cys analógica se disuelve en tampón fosfato salino (5-10 mg/ml) y se añade ácido tetraacético de etilendiamina 0,01 M (10-15% del volumen total). Se añade un exceso (2 veces) de reactivo maleimido metoxipEG (Nektar) y la reacción se agita a temperatura ambiente mientras se monitoriza el progreso de la reacción mediante HPLC. Después de 8-24 horas, la mezcla de reacción se acidifica y se carga en una columna de fase inversa preparativa para su purificación usando gradiente de TFA al 0,1%/acetonitrilo. Las fracciones apropiadas se combinaron y liofilizaron para dar los análogos pegilados deseados.

EJEMPLO 5

Síntesis de glucagón-Cex y otros análogos extendidos C-terminales.

[0395] Se colocaron 285 mg (0,2 mmoles) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) en un recipiente de reacción de 60 ml y se introdujo la siguiente secuencia y se procesó en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando acoplamientos simples FastBoc HBTU activados.

[0396] HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1948) La siguiente cadena lateral se utilizaron grupos protectores: Arg (Tos), Asp (OcHex), Asn (Xan), Cys (pMeBzl), Glu (OcHex), Su (Boc), Lys (2Cl-Z), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Trp (CHO) y Tyr (Br-Z). La resina de peptidilo completa se trató con piperidina al 20%/dimetilformamida para eliminar la protección de formilo de Trp, luego se transfirió a un recipiente de reacción de HF y se secó al vacío. Se añadieron 1,0 ml de p-cresol y 0,5 ml de sulfuro de dimetilo junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato de HF (Penninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo

seco/metanol, se evacuó y aprox. Se condensaron 10 ml de fluoruro de hidrógeno líquido. La reacción se agitó en un baño de hielo durante 1 hora y luego se eliminó el HF al vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el péptido se extrajo en 50 ml de ácido acético acuoso. Se realizó una HPLCAnalítica [0,46 x 5 cm Zorbax C8, 1 ml/min, 45C, 214 nm, tampón A de TFA al 0,1%, tampón B de TFA al 0,1%/ACN al 90%, gradiente = 10% B a 80% B sobre 10 min.] En una alícuota del extracto de escisión. El extracto se cargó en una columna preparativa de fase inversa Kromasil C18 de 2,2 x 25 cm y se corrió un gradiente de acetonitrilo para la elución usando un sistema Pharmacia FPLC. Se recogieron fracciones de 5 min mientras se controlaba la radiación UV a 214 nm (2,0 A). TFA al 0,1%, TFA al 0,1%/acetonitrilo al 50%. Gradiente = 30% B a 100% B durante 450 min. Las fracciones 58-65 se combinaron, congelaron y liofilizaron para dar 198,1 mg.

[0397] El análisis por HPLC del producto mostró una pureza superior al 95%. El análisis espectral de masas MALDI mostró la presencia de la masa teórica deseada de 4316,7 con el producto como una amida C-terminal. Se prepararon de forma similar oxintomodulina y oxintomodulina-KRNRcomo los ácidos carboxílicos C-terminales partiendo de la resina PAM cargada apropiadamente.

EJEMPLO 6

Síntesis de lactamas de glucagón

[0398] Se añadieron 285 mg (0,2 mmoles) de resina de metoxibenzhidrilamina (Midwest Biotech) a recipientes de reacción de 60 ml y se ensambló la siguiente secuencia en un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A modificado usando acoplamientos simples activados con Boc DEPBT.

[0399] HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT-NH2 (12-16 lactama; SEQ ID NO: 100).

[0400] La siguiente cadena lateral se utilizaron grupos protectores: Arg (Tos), Asp (Ochx), Asn (Xan), Glu (OFm), Su (BOM), Lys (Fmoc), Ser (Bzl), Thr (Bzl), Trp (CHO), Tyr (Br-Z). Se usó Lys (Cl-Z) en la posición 12 si las lactamas se construyeron a partir de 16-20, 20-24 o 24-28. La resina de peptidilo completa se trató con piperidina/dimetilformamida al 20% durante una hora con rotación para eliminar el grupo formilo Trp así como la protección Fmoc y OFm de Lys12 y Glu16. Tras la confirmación de la eliminación mediante una prueba de ninhidrina positiva, la resina se lavó con dimetilformamida, seguido de diclorometano y luego de nuevo con dimetilformamida. La resina se trató con 520 mg (1 mmol) de hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris-pirrolidino-fosfonio (PyBOP) en dimetilformamida y diisopropiletilamina (DIEA). La reacción prosiguió durante 8-10 horas y la ciclación se confirmó mediante una reacción negativa con ninhidrina. La resina se lavó con dimetilformamida, seguido de diclorometano y posteriormente se trató con ácido trifluoroacético durante 10 minutos. La eliminación del grupo Boc se confirmó mediante una reacción positiva con ninhidrina. La resina se lavó con dimetilformamida y diclorometano y se secó antes de transferirla a un recipiente de reacción de ácido fluorhídrico (HF). Se añadieron 500 µl de p-cresol junto con una barra de agitación magnética. El recipiente se unió al aparato de HF (Peninsula Labs), se enfrió en un baño de hielo seco/metanol, se evacuó y se condensaron aproximadamente 10 ml de ácido fluorhídrico líquido en el recipiente. La reacción se agitó durante 1 hora en un baño de hielo y posteriormente se eliminó el HF al vacío. El residuo se suspendió en éter etílico; los sólidos se filtraron, se lavaron con éter y el péptido se solubilizó con 150 ml de acetonitrilo al 20%/ácido acético al 1%.

[0401] Un análisis de HPLCAnalítica del péptido solubilizado en bruto se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones [4,6 X30 mm Xterra C8, 1,50 ml/min, 220 nm, un tampón de 0,1% TFA/10% de ACN, B tampón de 0,1% de TFA/100% ACN, gradiente 5-95% B durante 15 minutos]. El extracto se diluyó dos veces con agua y se cargó en una columna de fase inversa preparativa Vydac C4 de 2,2 x 25 cm y se eluyó utilizando un gradiente de acetonitrilo en un sistema Waters HPLC(tampón A de TFA al 0,1%/ACN al 10%, tampón B de TFA al 0,1%/CAN al 10% y un gradiente de 0-100% B durante 120 minutos a un flujo de 15,00 ml/min. El análisis por HPLCdel péptido purificado demostró una pureza superior al 95% y el análisis espectral de masas de ionización por electropulverización confirmó una masa de 3506 Da para la lactama de 12 a 16. Las lactamas de 16 a 20, 20 a 24 y 24 a 28 se prepararon de manera similar.

EJEMPLO 7

Preparación de péptidos acilados y/o PEGilados

[0402] Los péptidos acilados y/o PEGilados se preparan como sigue. Los péptidos se sintetizan en una resina de soporte sólida utilizando un sintetizador de péptidos CS Bio 4886 o un sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A. La química de neutralización in situ se utiliza como describen Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180 - 193 (1992). Para péptidos acilados, el residuo de aminoácido diana que se va a acilar (por ejemplo, posición diez) se sustituye con un residuo de lisina N ε -FMOC. El tratamiento del péptido protegido con BOCN-terminal completado con piperidina al 20% en DMF durante 30 minutos elimina los grupos FMOC/ formilo. El acoplamiento al residuo de ε-amino Lys libre se logra acoplando un exceso molar diez veces mayor de un aminoácido espaciador protegido con FMOC(p. Ej. FMOC- (N-BOC) -triptófano-OH) o una cadena de acilo (p. Ej. C17-COOH) y PyBOP o

reactivo de acoplamiento DEPBT en DMF/DIEA. La eliminación posterior del grupo FMOOC del aminoácido espaciador va seguida de la repetición del acoplamiento con una cadena de acilo. El tratamiento final con TFA al 100% da como resultado la eliminación de cualquier grupo protector de cadena lateral y el grupo BOCN-terminal. Las resinas peptídicas se neutralizan con DIEA/DMF al 5%, se secan y luego se escinden del soporte usando HF/p-cresol, 95: 5, a 0°C durante una hora. Despues de la extracción con éter, se utiliza una solución de HOAc al 5% para solvatar el péptido crudo. A continuación, se verifica que una muestra de la solución contenga el péptido de peso molecular correcto mediante ESI-MS. Los péptidos correctos se purifican mediante RP-HPLC usando un gradiente lineal de CH3CN al 10%/TFA al 0,1% a TFA al 0,1% en CH3CN al 100%. Para la purificación se utiliza una columna de proteínas Vydac C18 de 22 mm x 250 mm. Los análogos de péptidos acilados generalmente completan la elución en una proporción de tampón de 20:80. Las porciones se agrupan y se comprueba su pureza en una RP-HPLC analítica. Las fracciones puras se liofilizan produciendo péptidos sólidos blancos.

[0403] Si un péptido comprende un puente de lactama y residuos diana para estar acilado, acilación se lleva a cabo como se describe anteriormente con la adición de que el aminoácido a la cadena principal del péptido.

[0404] Para péptido pegilación, 40 kDa metoxi poli (etilenglicol) maleimido-propionamida (Chirotech Technology Ltd.) se hace reaccionar con un equivalente molar de péptido en urea 7 M, 50 mM tampón Tris-HCl usando la cantidad mínima de disolvente necesaria para disolver tanto el péptido como el PEG en una solución transparente (generalmente menos de 2 ml para una reacción con 2-3 mg de péptido). Se inicia una agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 4-6 horas y la reacción se analiza mediante RP-HPLC analítica. Los productos PEGilados aparecen de forma distinta al material de partida con tiempos de retención reducidos. La purificación se realiza en una columna Vydac C4 con condiciones similares a las utilizadas para la purificación inicial del péptido. La elución ocurre típicamente alrededor de proporciones de tampón de 50:50. Se recogen y liofilizan fracciones de péptido PEGilado puro.

[0405] Los péptidos se ensayaron para determinar la actividad biológica como se describió anteriormente en el Ejemplo 16. Los péptidos acilados pueden exhibir mayor potencia en el receptor de GLP-1. La inclusión de un espaciador de triptófano puede proporcionar una mejor potencia en el receptor de glucagón.

[0406] Mientras la acilación puede extender la vida media de un péptido a horas o más, la PEGilación con repeticiones en decenas de rangos kDa puede hacer aún más. Se preparan péptidos que comprenden ambos tipos de modificaciones. Se espera que estos péptidos exhiban una vida media extendida en circulación, así como resistencia a DPP-IV y otras proteasas.

EJEMPLO 8

Ensayo de unión al receptor de glucagón

[0407] La afinidad de péptidos al receptor de glucagón se midió en un ensayo de unión utilizando la tecnología de ensayo de proximidad de centelleo de competencia. Se mezclaron diluciones seriadas de 3 veces de los péptidos preparados en tampón de ensayo de proximidad de centelleo (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, albúmina de suero bovino al 0,1% p/v) en una placa de fondo blanco/transparente de 96 pocillos (Corning Inc., Acton, MA) con 0,05 nM (3-[¹²⁵I]-yodotirosil) Tyr10 glucagón (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), 1-6 microgramos por pocillo, fragmentos de membrana plasmática preparados a partir de células que sobreexpresan el receptor de glucagón humano, y perlas de ensayo de centelleo de proximidad de tipo A de aglutinina de germen de trigo tratadas con polietilenimina de 1 mg/pocillo (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Tras 5 min de agitación a 800 rpm en un agitador rotatorio, la placa se incubó 12 h a temperatura ambiente y luego se leyó en un contador de centelleo líquido MicroBeta1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Se midió la radiactividad unida no específicamente (NSB) en los pocillos con una concentración 4 veces mayor de ligando nativo "frío" que la concentración más alta en las muestras de prueba y se detectó radiactividad unida total en los pocillos sin competidor. La unión específica Se calculó el porcentaje de la siguiente manera: % unión específica = ((Bound-NSB)/(Total obligados- NSB)) X100. IC₅₀ valores se determinaron mediante el uso de software de Origen (OriginLab, Northampton, MA).

EJEMPLO 9

Ensayo funcional-Síntesis de AMPc

[0408] La capacidad de los análogos de glucagón para inducir cAMP se midió en un ensayo indicador de basado en la luciferasa de luciérnaga. Las células HEK293 cotransfectadas con un receptor (receptor de glucagón, receptor de GLP-1 o receptor de GIP) y el gen de luciferasa ligado al elemento sensible al cAMP se privaron de suero cultivando 16 h en DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 0,25% de suero de crecimiento bovino (Hyclone, Logan, UT) y después se incubaron con diluciones en serie de cualquiera de glucagón, GLP-1, GIP o nuevos análogos de glucagón durante 5 horas a 37 ° C, 5% de CO₂ en 96 pocillos de poli-D-lisina "Biocoat" Placas (BD Biosciences, San José, CA). Al final de la incubación, se añadieron a cada pocillo 100 microlitros de reactivo de sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). La placa se agitó brevemente, se incubó durante 10

minutos en la oscuridad y se midió la producción de luz en un contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones efectivas del 50% se calcularon utilizando el software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

5 EJEMPLO 10

Ensayo de unión al receptor de insulina:

[0409] La afinidad de cada péptido para la insulina o del receptor de IGF-1 se midió en un ensayo de unión que 10 utiliza la tecnología de proximidad de centelleo competencia. Se hicieron diluciones seriadas de 3 veces de los péptidos en tampón Tris-Cl (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5, NaCl 0,15 M, albúmina de suero bovino al 0,1% p/v) y se mezclaron en placas de 96 pocillos (Corning Inc., Acton, MA) con insulina (3- [125I] -yodotirosil) A TyrA14 0,05 nM o (3- [125I] -yodotirosil) IGF-1 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Una alícuota de 1-6 microgramos de 15 fragmentos de membrana plasmática preparados a partir de células que sobreexpresan la insulina humana o los receptores de IGF-1 estaban presentes en cada pocillo y 0,25 mg/pocillo de perlas de ensayo de proximidad de centelleo de aglutinina de germen de trigo tratadas con polietilenimina tipo A Biosciences, Piscataway, NJ) se agregaron. Después de cinco minutos de agitación a 800 rpm, la placa se incubó durante 12 ha temperatura ambiente y se midió la radiactividad con un contador de centelleo líquido MicroBeta1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Se midió la radiactividad unida no específicamente (NSB) en los pocillos con un exceso de concentración de 20 cuatro veces el ligando nativo "frío" que la concentración más alta en las muestras de prueba. Se detectó radiactividad total unida en los pocillos sin competidor. El porcentaje de unión específica se calculó como sigue: % de unión específica = (NSB unido/NSB unido total) x 100. Los valores de CI50 se determinaron utilizando el software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

25 EJEMPLO 11

Ensayo de fosforilación del receptor de insulina:

[0410] Para medir la fosforilación del receptor de insulina o análogo de insulina, receptor de células HEK293 30 transfectadas se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos (Costar # 3596, Cambridge, MA) y se cultivaron en Dulbecco modificado de Eagle Medium (DMEM) suplementado con 100 UI/ml penicilina, 100 mg/ml de estreptomicina, HEPES 10 mM y 0,25% de suero de crecimiento bovino (Hyclone SH30541, Logan, UT) durante 16-20 horas a 37 ° C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Se prepararon diluciones en serie de insulina o análogos de 35 insulina en DMEM suplementado con albúmina de suero bovino al 0,5% (Roche Applied Science # 100350, Indianapolis, IN) y se añadieron a los pocillos con células adheridas. Después de 15 min de incubación a 37 ° C en atmósfera humidificada con 5% de CO₂, las células se fijaron con paraformaldehído al 5% durante 20 min a temperatura ambiente, se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato pH 7,4 y se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2% en PBS para 1 hora. Despues, la placa se lavó tres veces y se llenó con anticuerpo 40 conjugado con peroxidasa de rábano picante contra fosftirosina (Upstate biotechnology # 16-105, Temecula, CA) reconstituido en PBS con albúmina de suero bovino al 2% según la recomendación del fabricante. Después de 3 horas de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó 4 veces y se añadió a cada pocillo 0,1 ml de sustrato de solución única TMB (Invitrogen, nº 00-2023, Carlsbad, CA). El desarrollo del color se detuvo 5 min más tarde añadiendo 0,05 ml de HCl 1 N. La absorbancia a 450 nm se midió en Titertek Multiscan MCC340 (ThermoFisher, Pittsburgh, PA). Absorbancia frente a péptidos curvas de respuesta de dosis de concentración se trazan y CE 45 valores se determinaron mediante el uso de software de Origen (OriginLab, Northampton, MA).

EJEMPLO 12

Procedimientos sintéticos para fusiones de incretina-insulina (increlinas)

[0411] El esquema 1, como se muestra en la figura 4A, proporciona el procedimiento para la síntesis del enlazador de aldehído. La reacción implica una adición de Michael en un solo paso de trifenilmetiltiol a acroleína (véase Org. Biomol. Chem. 2011, 9, 3825). La reacción transcurre con un rendimiento del 85-90% con el producto recuperado por evaporación del disolvente, seguido de trituración con hexano. A continuación, el material se recristaliza en acetato de etilo/hexano y es estable para el almacenamiento a temperatura ambiente.

[0412] La modificación regioselectiva de la cadena B N-terminal (Chem. Biol. Drogas. Des. 2007.69.132) con el enlazador se lleva a cabo en condiciones ácidas en un tampón de acetato de sodio a pH 4,0, la concentración de insulina es de 1 mg/ml, aunque puede llevarse a cabo a una concentración considerablemente mayor (Esquema 2; Fig. 4B). La aminación reductora utiliza un exceso de 1,5-2,0 veces del aldehído y un exceso molar de 30 veces de cianoborohidruro de sodio. La reacción se agita durante la noche y se controla mediante HPLC. Se detiene mediante la adición de glicina para consumir el exceso de aldehído. El producto se recupera mediante HPLC preparativa, con el rendimiento de isómero deseado del 60%.

[0413] El detritillation muestra en el Esquema 3 (Fig. 4C) se logra disolviendo el producto del Esquema 2 en TFA

puro que contiene 2% de triisopropilsilano, 2% H₂O en una concentración 5-10 mg/ml del derivado de insulina. El material destilitado se recupera mediante precipitación con éter y centrifugación con un rendimiento > 95%.

[0414] La conjugación con 2-tiopiridilo activado incretina (GLP-1, GIP o co-agonista) se logra mediante la combinación de los dos sólidos y co-disolviendo en guanidina 6 M, tampón de pH 6,0 a una concentración total de péptido de 20 mg/ml. La reacción se completa en 30-60 minutos y el producto se recupera mediante HPLCpreparativa (Esquema 4; Fig. 4D).

Procedimientos sintéticos

Síntesis de Trt-S- (CH₂)₂CHO (S-tritil-3-tiopropionaldehído)¹

[0415] 2,0 mmoles (553 mg) de trifenilmelanotiol (Trt-SH) se disolvieron en 4,0 ml de cloruro de metileno seco, 3,0 mmoles (418μL) de trietilamina se añadió junto con acroleína, 2,0 mmoles (134 l) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante 2 horas. La reacción se controló mediante cromatografía en capa fina (gel de sílice, n-hexano/cloruro de metileno 3: 1) que indicó que la reacción se había completado en este momento. El disolvente se eliminó a presión reducida y el residuo se trituró con n-hexano. El sólido bruto se recristalizó en una mezcla de acetato de etilo/hexano para obtener 530 mg, 80% de rendimiento.

Síntesis HS- (CH₂)₃-PheB1-Insulina humana²

[0416] 41,3 moles (240 mg) de la insulina humana (Sigma) se disolvió en un tampón que contiene 20 mM de NaOAc, 200 mM NaCl tampón se ajustó a pH 4,0. Se añadieron 100 pmoles (33 mg) de S-tritil-3-tiopropionaldehído en 1,0 ml de NMP a la solución junto con 1,2 micromoles (75 mg) de NaCNBH3. La reacción se agitó a temperatura ambiente. Se añadieron 40 pmoles adicionales del aldehído en 0,4 ml de NMP después de 6,0 horas y se dejó que la reacción prosiguiera durante la noche. El análisis LC/ MS indicó que solo quedaba una pequeña cantidad (<5%) de insulina sin modificar. La mezcla de reacción se centrifugó, el sedimento se disolvió en acetonitrilo/H₂O y se adsorbió en una columna HPLCpreparativa Luna C8 (2) de 250 mm x 21,2 mm y se eluyó con un gradiente lineal del 10-55% durante 90 minutos. Tampón A: ACN al 10%/TFA al 0,1%, Tampón B: ACN/TFA al 0,1%, caudal: 15 ml/min, monitorización a 220 nm. Las fracciones seleccionadas se reunieron y se liofilizaron para producir 144 mg, ~ 60% Trt-S- (CH₂)₃ insulina -PheB1-humano. El grupo tritilo se eliminó mediante el tratamiento de 100 mg del derivado protegido con 20 ml de TFA que contenía 2% de triisopropilsilano, 2% de agua durante 20 minutos, seguido de precipitación con éter dietílico y liofilización para producir HS- (CH₂)₃-PheB1-insulina humana en 95°C. % rendimiento.

Síntesis de péptido GLP-1/GIP/GLCG (componente incretina)

[0417] Los péptidos de incretina se sintetizaron usando la metodología estándar Fmoc/tBu- a una escala de 0,1 mmol en un sintetizador Applied Biosystems 433A comenzando con resina Rink ChemMatrix (fuente) utilizando un exceso de diez veces de aminoácido y activación DIC/ 6-Cl-HOBt. Se utilizó el siguiente esquema de grupo protector de cadena lateral: Arg (Pbf), Asp (OtBu), Asn (Trt), Cys (Trt), Gln (Trt), Glu (OtBu), His (Trt), Lys (Boc), Ser (tBu), Thr (tBut), Tyr (tBu). El acoplamiento de His N-terminal se consiguió tratando la resina de peptidilo con un exceso de diez veces de FmocHis (Trt) -OH, DEPBT y un exceso de veinte veces de DIEA en 5,0 ml de DMF durante 90 minutos. El grupo Fmoc N-terminal se eliminó mediante dos tratamientos de 20 minutos de piperidina al 20% en DMF. La escisión de la resina y la conversión simultánea a la forma activada de 2-ditiopiridilo activada se logró suspendiendo la resina en 5 ml de TFA que contenía 100 μl de triisopropilsilano, 100 μl de agua y 20 equivalentes de reactivo 2-Alditiol durante 2,0 horas. Los péptidos escindidos se precipitaron y se lavaron con éter dietílico y se disolvieron en acetonitrilo acuoso al 20% que contenía ácido acético al 1% y se purificaron por cromatografía preparativa. Los pesos moleculares de los péptidos se confirmaron mediante ionización por electropulverización o espectrometría de masas MALDI-TOF y se liofilizaron directamente o se purificaron mediante cromatografía de fase inversa.

Ligación del péptido GLP-1/GIP/GLCG y HS-(CH₂)₃-PheB1-Insulina humana.

[0418] Se colocaron 3,0 pmoles (17,7 mg) de HS- (CH₂)₃-PheB1-insulina humana y 3,0 pmoles (13,5 mg) de la 2-tiopiridil incretina en un pequeño vial y se disolvieron en 1,5 ml de guanidina 6,0 M tampón ajustado a pH 6,0. La reacción se agitó durante 1 hora, se diluyó con AcOH acuoso al 2% y se purificó mediante HPLCpreparativa para producir el 50% del material ligado después de la liofilización. Condiciones de HPLC: Luna C8 (2) columna de HPLCpreparativa de 250 mm x 21,2 mm y se eluyó con un gradiente lineal del 10-55% durante 90 minutos. Tampón A: ACN al 10%/TFA al 0,1%, Tampón B: ACN/TFA al 0,1%, caudal: 15 ml/min, monitorización a 220 nm.

EJEMPLO 13

[0419] Los conjugados de incretina-insulina (increlinas) de acuerdo con la presente divulgación se sintetizaron esencialmente como se describe en los Ejemplos 1-7 y 12, y se probaron *in vitro* para determinar la actividad agonista en cada uno de los receptores de GLP-1, GIP y de insulina esencialmente como se describe en los

Ejemplos 8-11. El extremo N-terminal de la cadena B se deriva para comprender un grupo alquilitol y la incretina tiene un aminoácido cisteína añadido para permitir que un enlace disulfuro enlace los dos péptidos. La abreviatura C(SS)-CH₂CH₂CH₂-B1 Insulina representa una insulina humana nativa de dos cadenas que se ha derivatizado en el extremo N-terminal de la cadena B con un grupo alquilitol. La abreviatura C(SS)-CH₂ CH₂ CH₂-B¹ Desdi 5 representa una insulina humana nativa que se ha derivatizado en el extremo N-terminal de la cadena B con un grupo alquilitol y los residuos B28 y B30 se han eliminado y B29 ligado directamente al extremo N-terminal de la cadena A a través de un enlace amida (este análogo monocatenario es inactivo en el receptor de insulina, pero el enlace amida B29 Lys es susceptible de escisión por la escisión de tripsina o Lys Cpara restaurar la estructura de dos 10 cadenas y actividad de insulina completa Por lo tanto, sin actividad enzimática, una increlina que comprende el análogo de insulina Desdi solo exhibirá la actividad incretina asociada y no la actividad en el receptor de insulina.

[0420] Las CE50 en el receptor de GLP-1 (GLP-1R), el receptor de GIP (GIPR) y el receptor de insulina (IR-B) se proporcionan en la Tabla 4.

15

20

25

30

35

40

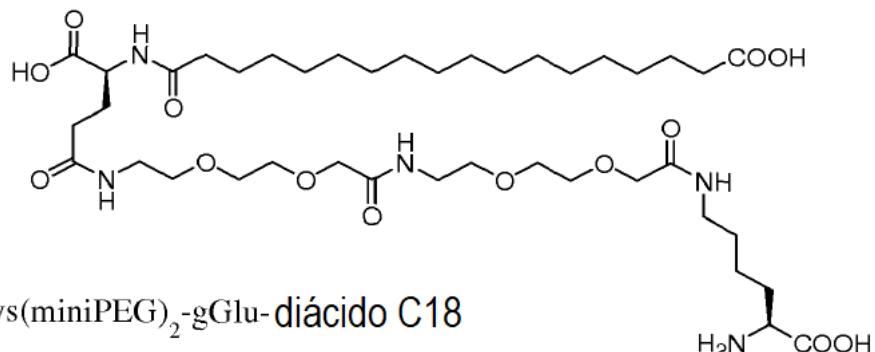
45

50

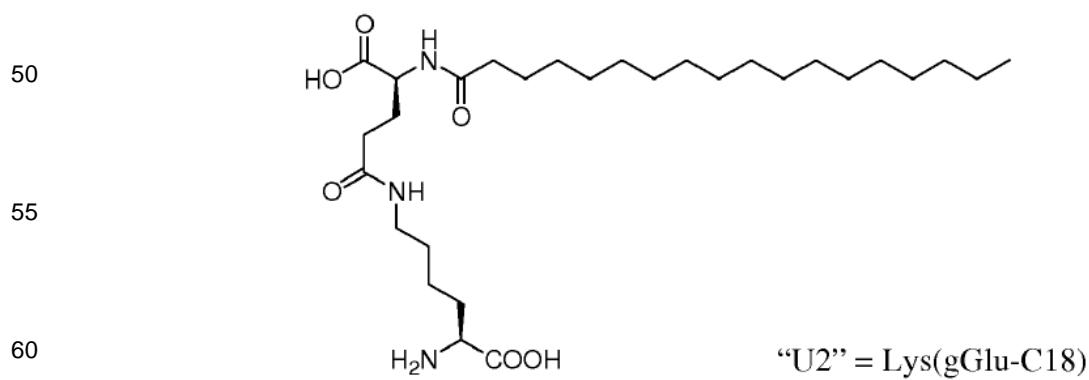
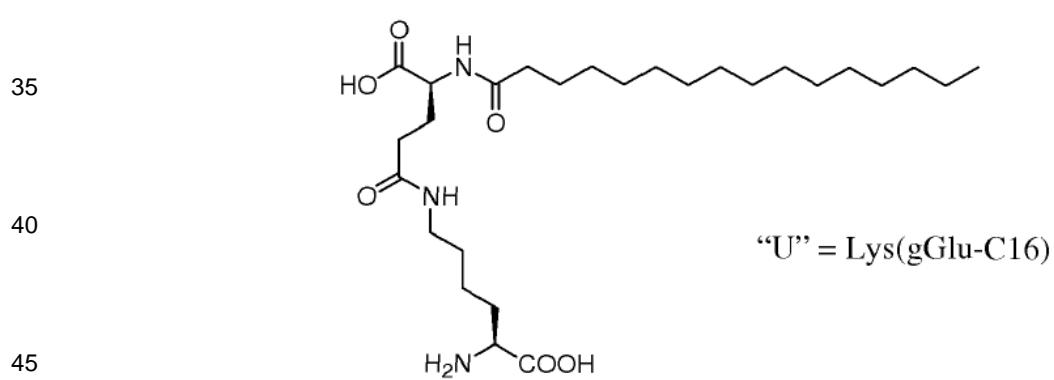
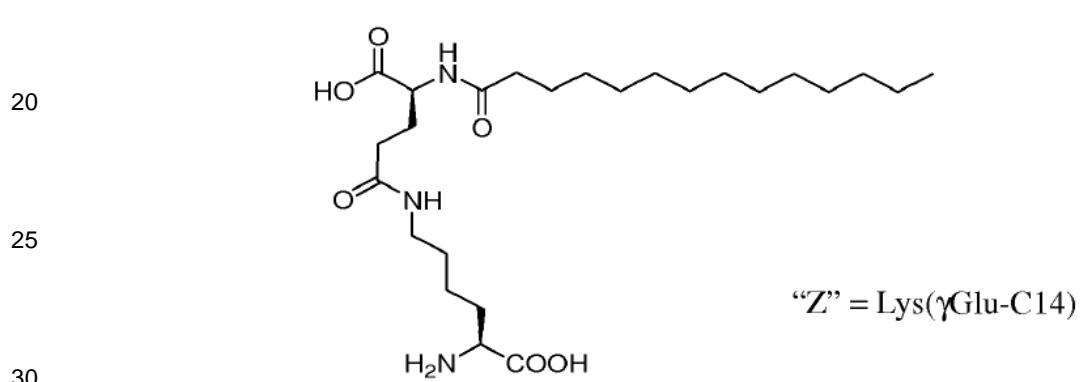
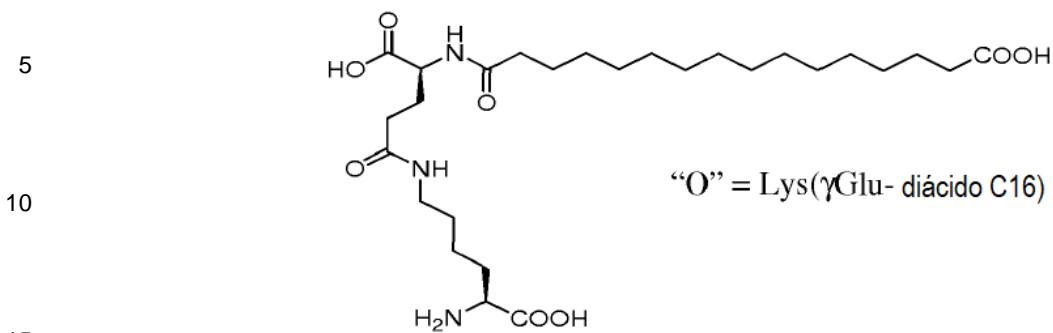
55

60

65



“B” = Lys(miniPEG)₂-gGlu-diácido C18



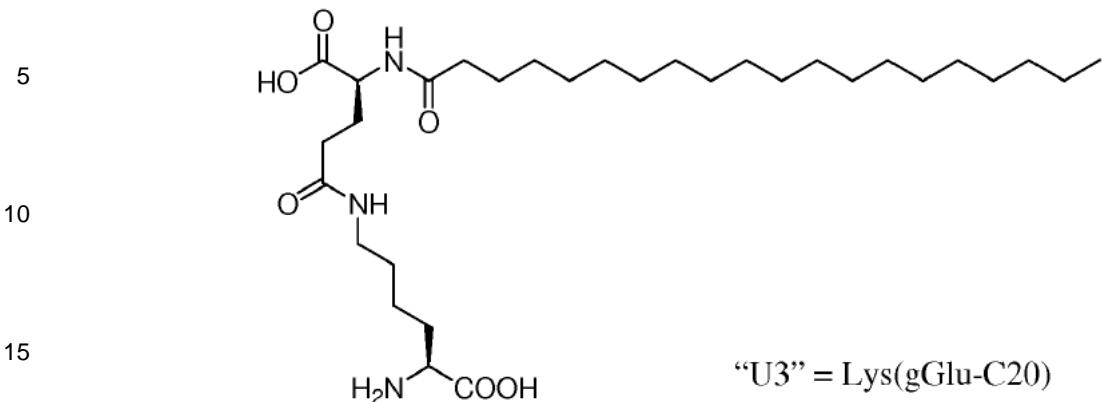


Tabla 4: Actividad in vitro de incretinas en receptores de GLP-1, GLP e insulina B

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 Normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP Normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B Normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas : X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoylC16), B = K(miniPEG)2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
Insulin				0.5000	
GLP-1	0.0250			HAEGLFTSDVSSYLEQAAKEFIAWL VKGRG-OH (SEQ ID NO: 703)	
GIP		0.0025		YAEGTIFISDYSIAMDKHHQQDFVNWL AQKGKKNDWKHNITQ-OH (SEQ ID NO: 707)	
CIU-001	0.0122	>10000	0.3220	HXEGTIFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLV KGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1942)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-002	0.0060		0.6800	HXEGTIFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLV KGGPSSGAPPSKG (SEQ ID NO: 1943)	Rcys(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-003	0.0040		0.4400	HXEGTIFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLV KGGPSSGAPPSKG (SEQ ID NO: 1944)	Pen(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-004	7.9600		0.5900	XEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIawlVK GGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1945)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-005	0.0034		0.4980	HXEGTIFTSDVSSYLEEQAAAREFIawlV RGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1946)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-006	0.0090		0.5500	HXEGTIFTSDVSSYLEEQAAKEFIawlV KGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1947)	C(S-S)-CH(CH ₃)CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-007			0.2400	HSQTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLM NTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1948)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina

(continuación)

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoylC16), B = K(miniPEG)2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-008			0.2400	HXQTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLM MNTGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1949)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-009			0.2500	SQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLM NTGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1950)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-010	0.0090		0.4400	HXEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWL KGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1951)	C(S-S)-CH ₂ -Ph-CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-011	0.1340	0.0240	0.6390	YXEGTFTSDYSTYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1952)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-012	0.0029	1.5450	1.0060	HXEGTFTSDUSSYLEQAAKEFIAWL KGGPSSGAPPSG (SEQ ID NO: 1953)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-013	0.0036	>1000	0.7590	HXEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWL KGGPSSGAPPSGU (SEQ ID NO: 1954)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-014	0.0059		>1000	HXEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWL KGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1955)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Minipro
CIU-019	0.0060		0.3390	HXEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWL KG (SEQ ID NO: 1956)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-020	0.7550		1.2800	XEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWL GGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 1957)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina

(continuación)

CIU#	EC50(nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50(nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50(nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
<i>.Abreviaturas: X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoylC16), B = K(miniPEG2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)</i>					
CIU-021	0.0041		1.4330	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL V KGGPSSGAPPSG (SEQ ID NO: 1958)	Pen(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-022	0.1344		1.0768	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL V KGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 1959)	Pen(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-023	0.0142		5.9750	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL V RGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1960)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B ²⁹ 20K PEG)
CIU-024	0.0049		0.6170	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL V RGGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1961)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B ²⁹ 20K PEG)
CIU-025	0.0252		30.6741	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL V RGGPSSGAPPSK (20K PEG) (SEQ ID NO: 1962)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B ²⁹ 20K PEG)
CIU-032				HXEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL V KGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 1963)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Desdi
CIU-033			0.9880	YXEGTFTSDVSSYLSIAMDKIHQQDFVNWL L AQRKGKKNDWKHNITQ (SEQ ID NO: 1964)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-034	0.00210		29.7299	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL V RGGPSSGAPPSK (10K PEG) (SEQ ID NO: 1965)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B ²⁹ 10K PEG)
CIU-037	0.0129		5.0067	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL V RGGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1966)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina

(continuación)

CIU#	EC50(nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50(nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50(nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de Insulina
Abreviaturas: : X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoyC16), B = K(miniPEG)2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-038a				GTNLSVPNPLGFFPDHQLDPAFRANSN NPWDWDFNPKNKDHWPEANKVG (SEQ ID NO: 1967)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-038b				C14- GTNLSSVPNPLGFFPDHQLDPAFRANSN NPWDWDFNPKNKDHWPEANKVG (SEQ ID NO: 1968)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-047	0.0130		8.2445	HXEGTFTSDVSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1969)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-048	0.0021		1.6800	HXEGTFTSDUSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPSK(10KPEG) (SEQ ID NO: 1970)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-049	0.0086		3.7280	HXEGTFTSDJSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 1971)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-050				HXEGTFTSDVSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1972)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina PEG-5KDa dímero
CIU-051				HXEGTFTSDVSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1972)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina PEG-10KDa dímero
CIU-052				HXEGTFTSDUSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1972)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina PEG-20KDa dímero
CIU-054	0.0304		3.1950	HXEGTFTSDVSSYLEQQAAAREFIAWLV RGGPSSGAPPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1973)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina

(continuación)

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoylC16), B = K(miniPEG)2-rGlu-C16 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-055	0.0205		1140.0000	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL RGGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1974)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ DesDi
CIU-056	0.0420		38.0900	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL PEG)WLVRGCPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1975)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-057	0.0925	36.1187	44.2422	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIK(10K PEG)WLVRGCPSSGAPPSK(10KPEG) (SEQ ID NO: 1976)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-058	1.8470	27.4590	20.4235	HSQGTFISDYSIYLDSRRAQDFVQWL MNTGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1977)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-059	7.3185	0.0185	14.7037	YXEGTFTSDYSIYLDRQAAXEFVNWL AGGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1978)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-066				C14- GTNL SVPNPRGFPPDHQLDPAFRANSN NPWDWFNPNKDHWPPEANKVG (SEQ ID NO: 1979)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-070				(HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL VRGGPSSGAPPSK ₂)PEG10kd dimer (SEQ ID NO: 1980)	C(S-S)-B ¹ Insulina
CIU-071				(HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL VRGGPSSGAPPSK ₂)PEG20kd dimer (SEQ ID NO: 1981)	C(S-S)-B ¹ Insulina
CIU-072				(HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFIAWL VRGGPSSGAPPSKS-S dimer (SEQ ID NO: 1982)	C(S-S)-B ¹ Insulina

(continuación)

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: X = Alb, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(miniPEG2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-075	0.1555	5.8580	14.2450	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFLAWLV RGK(20KPEG)PSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1983)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-076	0.0930	0.8550	84.0300	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAREFLAWLV RGK(10KPEG)PSSGAPPSK(10KPEG) (SEQ ID NO: 1984)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-077	130.9600	0.0270	7.0090	YXEGTFTSDYSIAMDRIHQXDFVNWL AQRGRRRNNDWRHNTQK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1985)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina =
CIU-078	39.7900	0.0110	6.4250	YXEGTFTSDYSIAMDRIHQXDFVNWL AGGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1986)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-079	0.0149	0.0009	1.6981	YXEGTFTSDYSIYLDKQAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1987)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-082	0.1254	0.0033	1.6918	YXEGTFTSDYSIYLDKQAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPPSU (SEQ ID NO: 1988)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-083	0.5370	14.6030	3.2280	HSQGTFITSDYSIYLDXRRAQDFVQWL MNTGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1989)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-084	0.3530	9.1340	4.6900	HSQGTFITSDYSIYLDXRRAQDFVQWL MNTGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1990)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-085	0.0109	0.0010	735.0000	YXEGTFTSDYSIYLDKQAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1991)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ DesDi

(continuación)

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC16), J = K(succinoylC16), O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-089	0.0062	0.0710	1.1990	HXEGTFTSDUSRYLDERAAQDFVQWL LDAGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1992)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-090	0.0064	0.0090	1.1230	HXQGTFTSDUSRYLDERAAQDFVQWL LDAGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1993)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-091	0.0090	0.0410	1.1070	HXEGTFTSDUSRYLDERAAQDFVQWL LDGGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1994)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-092	0.0057	0.2220	2.8845	HXEGTFTSDUSRYLDERAAQDFVQWL LDGGPSSGAPPSK (SEQ ID NO: 1995)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-093	0.4370	0.9640	1.8410	XEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL AGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1996)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-094		9.8850	8.0670	HSQGTFTSDYSRQLDSRRAQDFVQWL MNTGPSSGAPPSK(20KPEG) (SEQ ID NO: 1997)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-095	1.2970	>10000	16.0590	HXEGTFTSDYSKYLDERAAABDFVQWL LEGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1998)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-096	0.7770		>10000	HXEGTFTSDBSKYLDERAAQDFVQWL LEGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 1999)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-097	0.4160	3.4120	21.8550	HXEGTFTSDYSKYLDERAAQDFVQWL LEGGPSSGAPPSB (SEQ ID NO: 2000)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina

(continuación)

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: X = Alb, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoyC16), B = K(miniPEG2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-098	0.0033	5.5450	135.6000	HXEGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWL LEGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2001)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B29-B)
CIU-106	0.0132	0.0071	154.1400	YXEGTFTSDYSIYLQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2002)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B29-B)
CIU-107	2.9380	1.2550	6.2400	YXEGTFTSDBSIYLDKQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2003)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-108	2.8060	0.1860	5.5300	YXEGTFTSDYSIYLQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2004)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-112	1.0090	0.0800	1.7790	YXEGTFTSDYSIYLQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPSO (SEQ ID NO: 2005)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-113	2.2715	0.8010	2.0800	YXEGTFTSDOSIYLDKQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2006)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina
CIU-114	0.0180	0.0130	11.6470	YXEGTFTSDYSIYLQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2007)	C(S-S)—CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Insulina (B29-O)
CIU-115	0.0048	0.5530		HXEGTFTSDIISYLEEQAAKXFVNWL LAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2008)	QS- S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Desdi
CIU-116	2.0630	0.0010		YXEGTFTSDUSIYLDKQAAKXFVNWL AGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2009)	QS- S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ B ¹ Desdi

(continuación)

CIU #	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: X = Alb, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoylC16), B = K(miniPEG)2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-117	0.0845	0.0346	163.4700	YXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2010)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B'insulina (B ²⁹ -O)
CIU-118	0.0110	0.0034	1.5800	YXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2011)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B' (H ₂ NCO-A')insulina
CIU-119	0.0170	0.0035	6.1900	YXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2012)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -CO-B' insulina
CIU-123	0.0032	0.0036		HXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2013)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B'DesDi
CIU-146	0.0110	0.0014		YXEGTFTSDU2SIYLDKQAAAXEFVNWL LLAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2014)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B' DesDi
CIU-147	0.0130	0.0020		YXEGTFTSDU3SIYLDKQAAAXEFVNWL LLAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2015)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B' DesDi
CIU-173				YXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPS (SEQ ID NO: 2016)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B' insulina (Lys B ²⁹ -LCB)
CIU-178	0.4500	0.0580		YXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2017)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B' DesDi
CIU-179	0.1060	0.0200		YXEGTFTSDUSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2018)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ -B' DesDi

(continuación)

CIU#	EC50 (nM) PROM. DE GLP-1 normalizada	EC50 (nM) PROM. DE GIP normalizada	EC50 (nM) PROM. DE IR-B normalizada	Secuencia de incretina	Secuencia de insulina
Abreviaturas: : X = Aib, U = K(rEC16), Z = K(rEC14), J = K(succinoylC16), B = K(miniPEG)2-rGlu-C18 diacid, O = K(rGlu-C16 diacid)					
CIU-190	8.5800	0.0021	3.0110	YXEGTFISDYSIYLQAAAXEFVNWL AGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2019)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-191	0.1113	0.0026	>1000	YXEGTFTSDYSIYLQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2020)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ DesDi
CIU-192	>10	4.9570	1.4895	XEGTFTSDYSIYLQAAAXEAVNWLL AGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2021)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-197	0.0149	9.4060	2.5850	HXEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWL KGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2022)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-216	0.0160	0.3360		HXEGTFTSDVSSYLEKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2023)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina
CIU-225	0.0130	1.0100	4.4400	HXEGTFTSDVSIYLDKQAAAXEFVNWL LAGGPSSGAPPSU (SEQ ID NO: 2024)	C(S-S)-CH ₂ CH ₂ CH ₂ -B ¹ Insulina

EJEMPLO 14

Determinación de la tasa de escisión del dipéptido modelo (en PBS)

[0421] Un hexapéptido específico (HSRGTF-NH₂; SEQ ID NO: 2036) se utilizó como un péptido modelo sobre el que se podría estudiar la velocidad de escisión de dipéptidos extensiones N-terminales. Los péptidos modelo con dipéptido extendido se prepararon. Se añadieron sucesivamente sarcosina protegida con Boc y lisina a la resina unida al péptido modelo para producir el péptido A (Lys-Sar-HSRGTF-NH₂; SEQ ID NO: 2036). El péptido A se escindió mediante HF y se purificó mediante HPLCpreparativa.

[0422] Se determinó la velocidad de escisión para las respectivas propéptidos. Las concentraciones de los propéptidos y del péptido original modelo se determinaron por sus respectivas áreas de pico. Las constantes de velocidad de disociación de primer orden de los profármacos se determinaron trazando el logaritmo de la concentración del profármaco en varios intervalos de tiempo. La pendiente de esta gráfica proporciona la constante de velocidad 'k'. Las semividas para la escisión de los diversos profármacos se calcularon usando la fórmula $t_{1/2} = 0,693/k$. Se determinó que la vida media de la extensión de Lys-Sar a este péptido modelo HSRGTF-NH₂ (SEQ ID NO: 2036) era de 14,0 h.

EJEMPLO 15

Tasa de tiempo medio de escisión del dipéptido en plasma, determinada con un péptido modelo de isoforma d

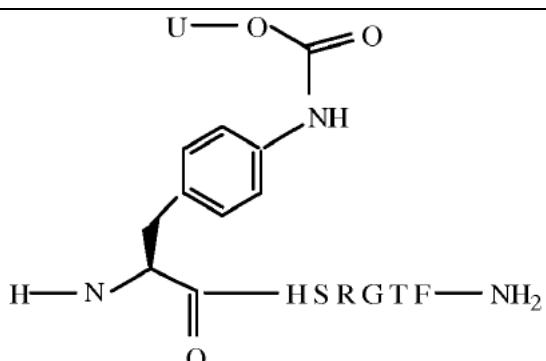
[0423] Un modelo hexapéptido adicional (dHdTdRGdTdF-NH₂ SEQ ID NO: 21) se utilizó para determinar la velocidad de escisión de dipéptido en el plasma. El isómero d de cada aminoácido se usó para prevenir la escisión enzimática del péptido modelo, con la excepción de la extensión del profármaco. Este modelo de hexapéptido del isómero d se sintetizó de forma análoga al isómero 1. La sarcosina y la lisina se añadieron sucesivamente al extremo N-terminal como se informó anteriormente para el péptido A para preparar el péptido B (dLys-dSar-dHdTdRGdTdF-NH₂ SEQ ID NO: 59)

[0424] Se determinó la velocidad de escisión para las respectivas propéptidos. Las concentraciones de los propéptidos y del péptido original modelo se determinaron por sus respectivas áreas de pico. Las constantes de velocidad de disociación de primer orden de los profármacos se determinaron trazando el logaritmo de la concentración del profármaco en varios intervalos de tiempo. La pendiente de esta gráfica proporciona la constante de velocidad 'k'. Se determinó que la vida media de la extensión de Lys-Sar a este péptido modelo dHdTdRGdTdF-NH₂ (SEQ ID NO: 21) era 18,6 h.

EJEMPLO 16

[0425] La velocidad de escisión de dipéptidos adicionales relacionados con el modelo hexapéptido (HSRGTF-NH₂; SEQ ID NO: 2036) se determinaron utilizando los procedimientos descritos en el Ejemplo 5. Los resultados generados en estos experimentos se presentan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2: Escisión de los dipéptidos O-U que están unidos a la cadena lateral de un para-amino-Phe N-terminal del modelo de hexapéptido (HSRGTF-NH₂; SEQ ID NO: 2036) en PBS



Compuestos	U (aminoácido)	O (aminoácido)	t1/2
1	F	P	58 h
2	hidroxil-F	P	327 h
3	d-F	P	20 h
4	d-F	d-P	39 h

5	G	P	72 h
6	hidroxil-G	P	603 h
7	L	P	62 h
8	terc-L	P	200 h
9	S	P	34 h
10	P	P	97 h
11	K	P	33 h
12	dK	P	11 h
13	E	P	85 h
14	Sar	P	~ 1000 h
15	Aib	P	69 min
16	hidroxil-Aib	P	33 h
17	ciclohexano	P	6 min
18	G	G	Sin escisión
19	hidroxil-G	G	Sin escisión
20	S	N-Metil-Gly	4,3 h
21	K	N-Metil-Gly	5,2 h
22	Aib	N-Metil-Gly	7,1 min
23	hidroxil-Aib	N-Metil-Gly	1,0 h

Tabla 3: Escisión de los dipéptidos U-O unidos a histidina (o derivado de histidina) en la posición 1 (X) del modelo de hexapéptido (XSRGTF-NH₂; SEQ ID NO: 17) en PBS

Compuesto	NH ₂ -U-O-XSRGTF-NH ₂			t1/2
	U (aminoácido)	O (aminoácido)	X (aminoácido)	
1	F	P	H	Sin escisión
2	hidroxil-F	P	H	Sin escisión
3	G	P	H	Sin escisión
4	hidroxil-G	P	H	Sin escisión
5	A	P	H	Sin escisión
6	C	P	H	Sin escisión
7	S	P	H	Sin escisión
8	P	P	H	Sin escisión
9	K	P	H	Sin escisión
10	E	P	H	Sin escisión
11	Deshidro V	P	H	Sin escisión
12	P	d-P	H	Sin escisión
13	d-P	P	H	Sin escisión
14	Aib	P	H	32 h
15	Aib	d-P	H	20 h
16	Aib	P	d-H	16 h
17	ciclohexil-	P	H	5 h
18	ciclopropil-	P	H	10 h
19	N-Me-Aib	P	H	> 500 h
20	α,α-dietil-Gly	P	H	46 h
21	hidroxil-Aib	P	H	61
22	Aib	P	A	58
23	Aib	P	N-metil-His	30 h
24	Aib	N-metil-Gly	H	49 min
25	Aib	N-hexil-Gly	H	10 min
26	Aib	Ácido azetidina-2-carboxílico	H	> 500 h
27	G	N-metil-Gly	H	104 h
28	hidroxil-G	N-metil-Gly	H	149 h
29	G	N-hexil-Gly	H	70 h
30	dK	N-metil-Gly	H	27 h
31	dK	N-metil-Ala	H	14 h
32	dK	N-metil-Phe	H	57 h
33	K	N-metil-Gly	H	14 h
34	F	N-metil-Gly	H	29 h
35	S	N-metil-Gly	H	17 h
36	P	N-metil-Gly	H	181 h

[0426] diversos derivados de profármacos En adición de análogos de insulina IGF1YL se han preparado en el que un elemento de dipéptido se ha unido a través de un enlace amida a través del residuo 4-amino-fenilalanina presente en A19 de la IGF1YL. El análisis in vitro de estos compuestos usando los procedimientos del Ejemplo 5 revela que la actividad de estos compuestos aumenta con el tiempo incubados en un tampón PBS o en plasma al 20%. Además, se midió la actividad in vitro del profármaco análogo de IGF MIU30: A1 (aF19 - dLys (Ac), Sar) (dipéptido unido a través y enlace amida al A19 4-aminoPhe) para la unión del receptor de insulina en relación con la insulina nativa sobre tiempo (1 hora, 3 horas, 6 horas, 9 horas y 10,5 horas) incubadas en plasma al 20%. La Tabla 10 3A compara la unión relativa del receptor de insulina a lo largo del tiempo incubado en plasma al 20%/PBS a 37 ° C.Como lo indican los datos presentados en un ensayo de unión in vitro, consulte la Tabla 3A y un ensayo de fosforilación in vitro, consulte la Tabla 3B. La actividad aumentada se recupera de la muestra de derivado de profármaco de IGF A19 con el tiempo, a medida que la forma de profármaco se convierte en el péptido IGF1YL activo.

15

Tabla 3A

Tiempo (h)	% de actividad de insulina
0	34,44%
9	100,09%
95	115,42%

20

Tabla 3B

Tiempo (h)	% de actividad de insulina
1	23,0
3	26,8
6	32,5
9	41,1
10,5	43,2

[0427] En vivo glucosa pruebas de tolerancia utilizando C57/Blk ratones administrados con análogo de insulina MIU-30a: B¹ (Y16, L17, Y25) 29a: A¹ (DLys (Ac), Sar-AF19) (dipéptido enlazados a través de y enlace amida al A19 4-aminoPhe), MUI 30 disuelto en PBS (pH 7,4) con 20% de plasma y se incubó durante 48 horas a 37 ° C(generando "MIU-30c"). Las muestras incubadas durante 0 horas (MUI 30a) y 48 horas (MUI 30c) se extrajeron y se inyectaron a ratones negros C57 a 90 nmol/kg y 270 nmol/kg para medir la disminución de glucosa (prueba de tolerancia a la insulina). En la figura 8A se muestra el perfil de disminución de glucosa de MIU 30a y MIU 30c en varios momentos durante 8 horas. El compuesto original tiene una potencia baja, pero después de la incubación en plasma al 20% durante 48 horas (generando "MIU-30c") la potencia aumenta (véase la Fig. 8A). En la figura 8B, la glucosa en sangre total de MUI 30a y MUI 30c en comparación con el vehículo se indica como área diferencial bajo la curva (AUC). A 90 nmol/kg, MUI 30a indica un pequeño cambio en la glucosa, mientras que MUI 30c provoca una disminución considerable. A 270 nmol/kg, tanto MUI 30a como MUI 30c muestran una disminución de la glucosa, pero la última muestra posee una potencia hipoglucémica significativamente mayor. En resumen, la forma de profármaco del análogo de insulina MIU30 muestra una potencia reductora de glucosa apreciablemente menor cuando se inyecta antes de la conversión ex vivo en condiciones fisiológicas al análogo de insulina original. Estos resultados in vivo son consistentes con el análisis in vitro. Se estima que la vida media del profármaco es de aproximadamente 20 horas.

EJEMPLO 17

40

Escisión de dipéptidos a partir de formas de profármacos de péptidos derivados de IGFB16B17

[0428] dipéptido La escisión de un (pNH₂-Phe) amida ligada AibPro de diversos péptidos de IGF-1 se midió para determinar el impacto de la secuencia de péptido o heterodúplex en la escisión de dipéptido. Los resultados para los péptidos probados se muestran en la Tabla 11 y los datos revelan que la cadena de IGF1-A sola representa un buen modelo para el estudio de la vida media del profármaco para los péptidos IGF1 B: A (YL)^{B16,17}.

50

Tabla 11

Péptido parental	Vida media (h)
IGF1A (Ala) ^{6,11,20} (pNH ₂ -Phe) ^{A19}	2,2
IGF1A (Acm) ^{6,11,20} (pNH ₂ -Phe) ¹⁹	1,8
IGF1 B: A (SS) ^{A7, B7} (AcM) ^{A6,11,20, B19} (pNH ₂ -Phe) ^{A19}	1,8
IGF1 B: A (pNH ₂ -Phe) ^{A19}	1,6

La comparación de los derivados del profármaco de la cadena A del IGF con respecto a la cadena A unida por disulfuro y el constructo de la cadena B (IGF1 A: B ($\text{Y}^{\text{B}16}\text{L}^{\text{B}17}$) reveló que los dos compuestos tenían semividas similares para la forma del profármaco. En consecuencia, el IGF1A Se determinó que la cadena por sí sola es un buen modelo para el estudio de la vida media del profármaco en IGF1 B: A ($\text{Y}^{\text{B}16}\text{L}^{\text{B}17}$). Tenga en cuenta que el derivado de AibAla no se escinde y, por lo tanto, no es un profármaco, pero sirve para mostrar el la modificación puede inactivar la amida del análogo de insulina IGF1 A: B ($\text{Y}^{\text{B}16}\text{L}^{\text{B}17}$) ($\text{p-NH}_2\text{-F}$)^{A19}. Por simplicidad, las semividas de profármaco se determinaron utilizando sólo la cadena A de IGF1 en ausencia de la cadena B. Las vidas medias de cada propéptido se determinaron como se describe en el Ejemplo 5. Los datos se presentan en la Tabla 12:

10 Tabla 12: Vida media del dipéptido en amida extendida del dipéptido IGF1 ($\text{p-NH}_2\text{-F}$)^{A19}

Dipéptido		Vida media (h)
Aib	Pro	2,2
AibOH	Pro	165,0
Aib	dPro	1,9
AibOH	Sar	2,3
dK(acetilo)	Sar	16,3
K	Sar	21,8
K(acetilo)	N-metil Ala	23,6
dK(acetilo)	N-metil Ala	35,3

[0429] Los datos muestran que mediante la alteración de los sustituyentes en el elemento de dipéptido profármaco que la vida media de profármaco se puede variar desde 2 horas a > 100 hrs.

15 [0430] profármacos adicional péptidos derivados se prepararon usando un IGF1-A ($\text{pNH}_2\text{-F}$)¹⁹ péptido base y la alteración de la composición de aminoácidos del elemento de dipéptido profármaco unido a través de la 4-amino fenilalanina en la posición A19. Se midieron las semividas de los dipéptidos para diferentes construcciones tanto en PBS como en plasma al 20%/PBS (es decir, en presencia de enzimas séricas. Los resultados se proporcionan en la 20 Tabla 13. Los resultados indican que tres de los cuatro péptidos probados no se vieron afectados por enzimas séricas.

EJEMPLO 18

25 Biosíntesis y purificación de análogos de insulina de cadena única

[0431] Un minigén de insulina-IGF-I que comprende una insulina B nativo y la cadena A unido a través de la cadena de IGF-I C($\text{B}^0\text{-C}^1\text{-A}^0$) se clonó en vector de expresión pGAPZα A (comprado a Invitrogen) bajo GAP promotor (promotor de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)) para la expresión constitutiva y purificación de 30 proteína recombinante en levadura Pichia pastoris. El minigen se fusionó con un péptido N-terminal que codifica la señal líder del factor de apareamiento α de Saccharomyces cerevisiae para la secreción de la proteína recombinante en el medio. Se usó un sitio de escisión Kex2 entre el minigen y la secuencia del factor de apareamiento α principal para escindir la secuencia líder para la secreción del minigén con extremos amino nativos. Se introdujeron 35 mutaciones de alanina de un solo sitio en el péptido Cen las posiciones 1 (G1A), 2 (Y2A), 3 (G3A), 4 (S4A), 5 (S5A), 6 (S6A), 7 (R7A), 8 (R8A)), 10 (P10A), 11 (Q11A) y 12 (T12A) del minigen B⁰-C¹-A⁰.

[0432] Los minigenes incluyendo B⁰-C¹-A⁰, once mutantes de alanina, y otros derivados seleccione se transformaron en la levadura Pichia pastoris por electroporación. Los transformantes positivos se seleccionaron en placas de metanol mínimo y se realizó una preparación genómica de cada aislado de Pichia y se confirmó la 40 integración de las construcciones en el genoma de la levadura mediante PCR. Se visualizó un producto de PCR de 833 pares de bases en un gel de ADN de agarosa. Los análogos de insulina se produjeron por fermentación de una línea de levadura correspondiente. Las células de levadura se sedimentaron mediante centrifugación a 5 K durante 20 minutos en tubos de centrífuga Beckman de 500 ml y el medio se mantuvo para la posterior purificación de 45 proteínas.

[0433] Los sobrenadantes del medio de crecimiento se filtraron a través de 0,2 micras filtro Millipore. Se añadió acetonitrilo (ACN) al sobrenadante hasta un volumen final del 20%. El sobrenadante se purificó sobre una resina Amberlite XAD7HP de Sigma, preequilibrada con ACN acuoso al 20%. A continuación, la resina se enjuagó dos veces con 30 ml de ACN acuoso al 20% y los contaminantes se eliminaron con ACN acuoso al 30% que contenía 50 TFA al 0,1%. Los análogos de insulina parcialmente purificados se eluyeron de la columna con ACN acuoso al 54% que contenía TFA al 0,1% y se liofilizaron. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en $\text{NH}_3\text{ HCO}_3$ 0,025 M pH 8 y se purificaron en una columna Luna C18 (tamaño de partícula de 10 μm, tamaño de poro de 300 Å^o). La proteína se eluyó de la columna usando un gradiente lineal de ACN acuoso al 20-60%. Las fracciones positivas para MALDI-MS se combinaron y se transfirieron a un vial de centelleo desecharable para su posterior liofilización. A continuación, 55 las muestras liofilizadas se resuspendieron en ACN acuoso al 20% que contenía TFA al 0,1% y se purificaron en una

columna Luna C18 (tamaño de partícula de 10 μm, tamaño de poro 300Aº). La proteína se eluyó de la columna usando un gradiente lineal de ACN acuoso al 18-54% con TFA al 0,1%. La elución de proteínas se controló a una absorbancia de 280 nm. Las fracciones positivas de MALDI-TOF MS se analizaron mediante una columna analítica C8 para asegurar la pureza.

- 5 [0434] El análogo B⁰-C¹-A⁰ demostró una potencia que era igualmente eficaz en ambas isoformas del receptor de insulina y el receptor IGF-1. La mutación de la tirosina en la posición 2 a alanina o el acortamiento del péptido Cα ocho aminoácidos mediante la delección de C9-12 proporcionó una mejora selectiva en la especificidad de la acción 10 de la insulina mediante una reducción significativa de la actividad del receptor de IGF-1. Consulte los datos proporcionados en las Tablas 14A y 14B:

Tabla 14A

Análisis de unión a insulina y fosforilación (B ⁰ C ¹ A ⁰)				
Péptido	Unión a insulina		Fosforilación de insulina	
	IC ₅₀ , nM	n	EC ₅₀ , nM	n
Insulina	0,54 ± 0,02	4	1,67 ± 0,13	1
IGF-1	18,81 ± 1,77	3	29,20 ± 8,41	1
010 (B ⁰ C ¹ A ⁰)	2,83 ± 0,52	2	1,93 ± 0,43	1
G1A	1,21 ± 0,15	1	2,4 ± 0,24	1
Y2A	1,95 ± 0,28	3	1,86 ± 0,42	1
G3A	1,41 ± 0,05	2	2,13 ± 0,02	1
S4A	0,84 ± 0,47	2	0,76 ± 0,35	1
S5A	0,93 ± 0,44	1	2,23 ± 1,27	1
S6A	1,15 ± 0,24	1	2,33 ± 1,65	2
R7A	6,04 ± 0,82	1	5,21 ± 4,14	1
R8A	0,63 ± 0,09	1	2,03 ± 0,06	2
P10A	2,86 ± 0,93	1	2,59 ± 1,2	1
Q11A	1,79 ± 0,47	1	2,58 ± 0,83	1
T12A	1,2 ± 0,18	1	2,83 ± 1,31	1

15

Tabla 14b

Análisis de unión a IGF-1 y fosforilación (B ⁰ C ¹ A ⁰)				
Péptido	Unión a IGF-1		Fosforilación de IGF-1	
	IC ₅₀ , nM	n	EC ₅₀ , nM	n
Insulina	60,63 ± 4,43	1	48,66 ± 1,59	1
IGF-1	0,38 ± 0,07	1	0,68 ± 0,41	1
010 (B ⁰ C ¹ A ⁰)	4,49 ± 1,04	1	1,29 ± 2,28	1
G1A	42,36 ± 16,24	1	1,4 ± 0,62	1
Y2A	257,9 ± 29,59	1	35,6 ± 14,55	1
G3A	34,02 ± 16,09	1	7,85 ± 0,78	1
S4A	15,30 ± 3,10	1	1,64 ± 1,65	1
S5A	13,06 ± 3,01	1	2,63 ± 1,88	1
S6A	2,44 ± 0,79	1	1,54 ± 0,62	2
R7A	43,86 ± 8,72	1	1,26 ± 1,55	1
R8A	10,85 ± 1,47	1	0,50 ± 0,23	2
P10A	6,42 ± 0,47	1	2,79 ± 1,12	1
Q11A	4,23 ± 0,43	1	0,41 ± 0,69	1
T12A	9,15 ± 0,83	1	1,44 ± 1,36	1

- 20 [0435] La mayoría de los análogos selectivos de insulina fueron aquellos que faltan los últimos cuatro residuos del C-péptido, tenían una mutación de alanina en la posición dos del C-péptido, o una combinación de los dos cambios.

Tabla 13: Vida media del dipéptido en IGF1-A (pNH2-F)¹⁹

Vida media (h)			
		PBS	Plasma al 20%/PBS
Aib	Pro	2,2	2,1
Aib	dPro	2,1	2,2
AibOH	Sar	2,3	

dK	N-isobutil Gly	4,4	4,1
dK	N-hexil Gly	10,6	
dK(Acetilo)	Sar	17,2	
K	Sar	21,8	5,9
K(acetilo)	N-metil Ala	23,6	
dK(acetilo)	N-metil Ala	35,3	
AibOH	Pro	165,0	
K(acetilo)	Ácido azetidina-2-carboxílico	No escindible	
dK(acetilo)	Ácido azetidina-2-carboxílico	No escindible	

EJEMPLO 19

Pruebas de tolerancia a la insulina

5

Administración única

[0436] Ratones de seis a ocho semanas de edad, macho, C57BL/6 se mantuvieron a 23 ° C, humedad constante, y un ciclo de luz-oscuridad de 12 h. Los efectos agudos *in vivo* de péptidos seleccionados se evaluaron inyectando subcutáneamente péptidos solubilizados en solución salina tamponada fisiológicamente o un vehículo de control a ratones normales o diabéticos. La glucosa en sangre se midió en varios puntos de tiempo a lo largo de un período de 24 horas después de la administración de los péptidos. Cada grupo de ratones contenía 8 animales por grupo. El peso corporal medio fue de -25 g. Los ratones se hicieron diabéticos mediante la administración de estreptozotocina.

15 Administración en serie

[0437] Repetir diariamente la administración subcutánea de los péptidos o vehículo de control se administró a los ratones durante períodos de cinco días a dos semanas. Los ratones obesos recibieron una dieta diabetógena. Los ratones tenían acceso libre al agua y fueron alimentados ad libitum con una dieta alta en grasas (HFD) que comprendía el 58% de las calorías de la grasa (D12331; Research Diets, New Brunswick, NJ) y cada grupo de ratones contenía 8 animales por grupo. El peso corporal promedio fue de ~50 g y los ratones eran machos de ~6 meses. El peso corporal y la ingesta de alimentos se midieron los días en que se administró el péptido o el control del vehículo a los ratones. Se midieron repetidamente los niveles de glucosa en sangre en ayunas.

25 EJEMPLO 20

Procedimiento de infusión de glucosa graduada en monos cynomolgus

[0438] Se seleccionaron doce monos machos no vírgenes de una colonia, alojados en una sola vivienda, mantenidos en un ciclo estándar de luz-oscuridad de 12:12 horas a 22 ° C con acceso libre a una dieta estándar de pienso (Harlan) y agua, y agrupados según los pesos corporales equiparados (4 kg) en tres grupos de tratamiento diferentes ($n = 4$). Veinticuatro horas antes de la infusión de dextrosa graduada, se administró a los monos solución salina o péptidos mediante una única inyección subcutánea. Los monos de todos los grupos de prueba se mantuvieron en ayunas durante 16 horas antes del inicio de la infusión de dextrosa graduada. Treinta minutos antes de la infusión de dextrosa, los monos fueron sedados con Telazol (por vía intramuscular, 7 mg/kg) y se colocó un catéter intravenoso para la infusión de dextrosa en la vena cefálica. Se obtuvieron muestras de sangre basales de la arteria o vena femoral 20, 10 y 0 min antes de la infusión de dextrosa. A los 0 min, se inició una infusión de una solución de dextrosa a 5 mg/kg por minuto y se extrajo sangre después de 10 y 20 min. Inmediatamente después de recolectar la muestra de sangre de 20 minutos, la velocidad de infusión de dextrosa se incrementó a 10 mg/kg por minuto, y se tomaron nuevamente muestras de sangre después de 10 y 20 minutos de infusión a esa velocidad. Justo después de recolectar la muestra de sangre de 40 minutos, la velocidad de infusión de dextrosa se incrementó a 25 mg/kg por minuto, y se extrajo sangre después de 10 y 20 minutos de infusión a esa velocidad.

[0439] La sangre se recogió en EDTA y aprotinina que contiene (unidades 250 calicreína inhibidoras/ml) tubos. Se midieron glucosa, insulina y péptido Cen plasma, que se preparó a partir de cada una de las muestras de sangre descritas anteriormente. Se proporcionaron muestras de plasma a Millipore para medir la concentración del compuesto. La insulina se midió mediante un inmunoensayo quimioluminiscente de partículas paramagnéticas (Beckman Coulter Access 2), y la glucosa se midió mediante el procedimiento de la hexoquinasa (Roche Hitachi 917). Los resultados del experimento se proporcionan en las Figuras 35A y 35B.

50

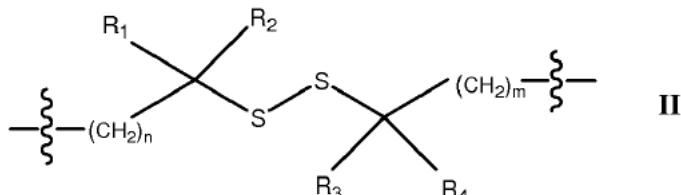
- puertos, se midió la glucosa en sangre con un glucómetro de mano. Usando el mismo glucómetro para todos los animales, se tomaron dos lecturas para asegurarse de que los valores fueran consistentes. Los animales se asignaron al azar por nivel de glucosa para lograr una distribución equilibrada entre los grupos. En cada punto de tiempo especificado, se recogieron ~ 3 ml de sangre completa en tubos de recogida de sangre que contenían
- 5 K3EDTA como anticoagulante y 100 µg/ml de aprotinina y se colocaron en un baño de hielo inmediatamente después de la recogida. Las muestras de sangre total se centrifugaron dentro de los 30 minutos posteriores a la recolección y se obtuvieron y almacenaron al menos 0,5 ml de plasma para análisis futuros, incluida la PK de insulina (ensayo basado en ELISA). Una pequeña porción de la muestra de sangre completa de 3 ml (antes de colocarla en los tubos de extracción de sangre) se utilizó para controlar la glucosa en sangre con un glucómetro de
- 10 mano inmediatamente después de la recolección. Los resultados del experimento se proporcionan en las Figuras 36 y 37.

REIVINDICACIONES

1. Conjugado de incretina-insulina que comprende
un péptido de incretina;

5 un péptido agonista de insulina, en el que el conjugado tiene actividad agonista tanto en el receptor de insulina como en el receptor de incretina correspondiente y el péptido de incretina está unido al péptido de insulina a través de un espaciador de cadena lineal de 5 a 10 átomos, en el que el espaciador comprende la estructura general de Fórmula II:

10



15

20 en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 0 o 1, y m es 1, 2 o 3, en el que el extremo carboxi terminal del péptido de incretina está unido al extremo N-terminal del péptido de insulina a través del resto disulfuro de Fórmula II.

25 2. Conjugado de la reivindicación 1, en el que el péptido de incretina se selecciona del grupo que consiste en X₁X₂EGTFTSDX₁₀SIYLDKQAX₂₀EFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 2037) y X₁X₂EGTFTSDVSIYLDKQAX₂₀EFVNWLLAGGPSSGAPPPSX₄₀ (SEQ ID NO: 2038), en las que

X₁ es His o Tyr;

X₂ es ácido aminoisobutírico;

30 X₁₀ es Lys acilada con un grupo alquilo C16 a C20 opcionalmente mediante un enlazador gamma Glu; X₂₀ es ácido aminoisobutírico; y

X₄₀ es Lys acilada con un grupo alquilo C16 a C20 opcionalmente mediante un enlazador gamma Glu, en el que

dicho péptido de insulina comprende

35 una secuencia de cadena A de GIVEQCCTX₈SICSLYQLENYCX₂₁ (SEQ ID NO: 3); y

una secuencia de cadena B de R₂₂-HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅ (SEQ ID NO: 15), en la que la cadena B está unida a la cadena A a través de enlaces disulfuro; y

R₂₂ es un enlace, o una secuencia de 1 a 4 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un FVNQ (SEQ ID NO: 12), FVKQ (SEQ ID NO: 8), VNQ, NQ y Q;

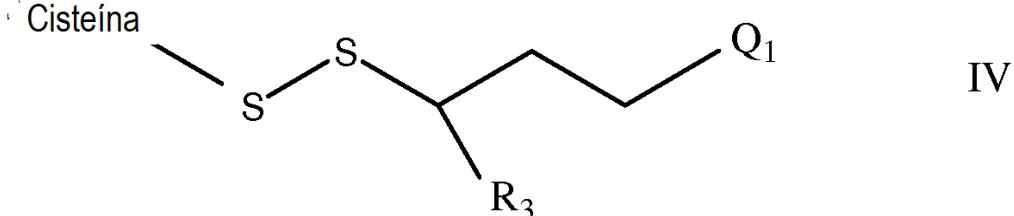
40 X₈ se selecciona del grupo que consiste en treonina e histidina;

X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en asparagina, lisina, glicina, alanina; y

X₄₅ es histidina, tirosina o fenilalanina.

45 3. Conjugado, según la reivindicación 2, en el que dicho espaciador de cadena lineal que une la incretina al péptido de insulina comprende la estructura general de Fórmula IV:

50



55

en el que el aminoácido cisteína del espaciador de cadena lineal está unido al extremo carboxilo de la incretina mediante un enlace amida y Q₁ es N-terminal de la cadena B de insulina, y en el que el péptido de insulina comprende

60 una secuencia de cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1); y

una secuencia de cadena B seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9).

FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (SEQ ID NO: 5) y FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (SEQ ID NO: 6).

65

4. Conjugado de la reivindicación 1, en el que el aminoácido C-terminal de los péptidos de incretina está unido covalentemente al péptido de insulina mediante dicho espaciador de cadena lineal en la alfa amina N-terminal de la cadena B; comprendiendo dicho péptido de insulina

5 una secuencia de cadena A de GIVEQC₈SICSLYQLENYC₂₁ (SEQ ID NO: 3); y una secuencia de cadena B de R₂₂-HLCGSHLVEALYLVCGERGFX₄₅ (SEQ ID NO: 15), en la que la cadena B está unida a la cadena A a través de enlaces disulfuro; y R₂₂ es un enlace, o una secuencia de 1 a 4 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en un FVNQ (SEQ ID NO: 12), FVKQ (SEQ ID NO: 8), VNQ, NQ y Q;

10 X₈ se selecciona del grupo que consiste en treonina e histidina; X₂₁ se selecciona del grupo que consiste en asparagina, lisina, glicina, alanina; y X₄₅ es histidina, tirosina o fenilalanina; y dicho péptido de incretina comprende la secuencia X₈₀X₈₁X₈₂GTFSDYSX₈₃YLX₈₄X₈₅X₈₆X₈₇AX₈₈X₈₉FX₉₀X₉₁WLX₉₂X₉₃X₉₄-Z₁ (SEQ ID NO: 1928), en la que

15 X₈₀ es His, Tyr, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homohistidina o ácido alfa, alfa-dimetilimidazol acético (DMIA) N-metil histidina, alfa-metil histidina o ácido imidazol acético; X₈₁ es Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina o ácido aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina y D-alanina; X₈₂ es Gln o Glu;

20 X₈₃ es Lys o Ile;

20 X₈₄ es Asp o Glu;

25 X₈₅ es Lys, Arg, Ser o Glu;

25 X₈₆ es Arg o Gln;

25 X₈₇ es Ala o Arg;

25 X₈₈ es ácido aminoisobutírico, Gln o Lys;

25 X₈₉ es Asp o Glu;

25 X₉₀ es Val o Ile;

25 X₉₁ es Asn, Gln o Ala;

25 X₉₂ es Leu, Val o Met;

25 X₉₃ es Ala, Asp, Lys, Asn o Ala;

30 X₉₄ es Gly o Thr; y Z₁ se selecciona del grupo que consiste en -COOH, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820), KRNRRNNIA (SEQ ID NO: 821) y KRNR (SEQ ID NO: 822).

5. Conjugado de la reivindicación 4, en el que

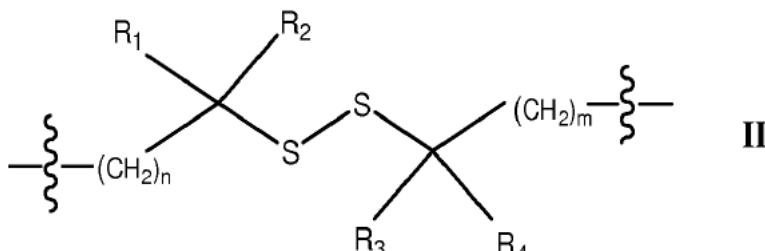
X₈₀ es His o Tyr;

35 X₈₆ es ácido aminoisobutírico; y

Z₁ es GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820).

6. Conjugado de la reivindicación 4, en el que dicho péptido de incretina es un péptido seleccionado del grupo que consiste en Y(aib)EGTFTSDYSIYLDKQAA(aib)EFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 756), H(aib)QGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWLLGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1931), H(aib)EGTFTSDVSSYLEEQAQAEFIAWLVKGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1932), HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1933), y YaibEGTFISDYSIYLDRQAAibEFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1934)

40 dichos espaciadores de cadena lineal que une la incretina con el péptido de insulina comprende la estructura general de Fórmula II:

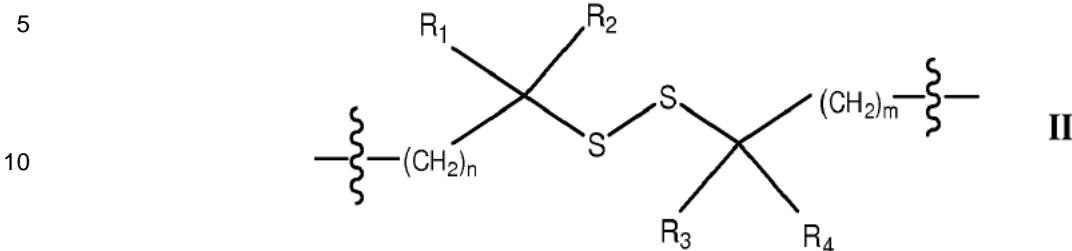


50 en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, y CH₃, n es 0 o 1 y m es 1, 2 o 3; y

55 dicho péptido de insulina comprende una secuencia de la cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLENYC₁₃ (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de la cadena B seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (SEQ ID NO: 5), FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (SEQ ID NO: 6).

65 7. Conjugado de cualquiera de las reivindicaciones 4-6 en el que

dicho espaciador de cadena lineal que une la incretina al péptido de insulina comprende la estructura general de Fórmula II:

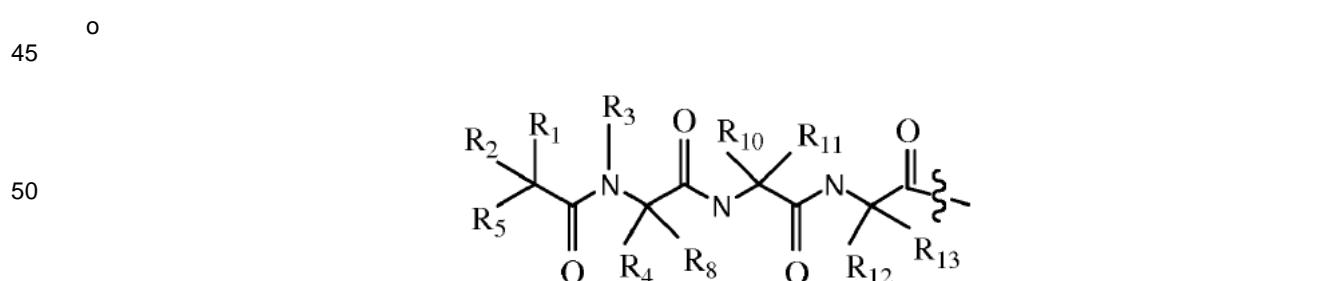
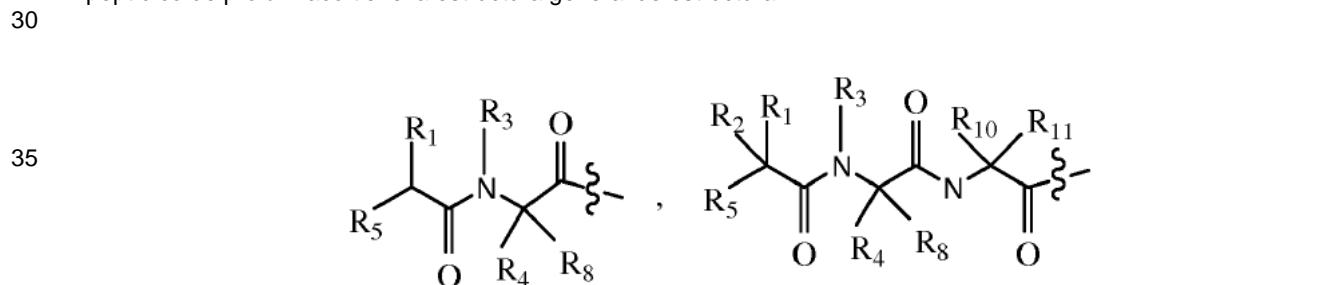


en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H y CH₃, n es 0 y m es 2.

8. Conjugado de la reivindicación 1, en el que

20 dicho péptido de incretina comprende la secuencia Y(aib)EGTFTSDYSIYLDKQAA(aib)EFVNWLLAGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 756), o H(aib)QGTFTSDYSKYLDERAQDFVQWLLDGGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1931); y
dicho péptido de insulina comprende una secuencia de cadena A de GIVEQCCTSICSLYQLENYCN-R₁₃ (SEQ ID NO: 1) y una secuencia de cadena B seleccionada del grupo que consiste en FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTPKT (SEQ ID NO: 2), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTKPT (SEQ ID NO: 9), FVNQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTDKT (SEQ ID NO: 5) y FVKQHLCGSHLVEALYLVCGERGFFYTEKT (SEQ ID NO: 6).

25 9. Derivado profármaco del conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que un elemento peptídico de profármaco tiene la estructura general de estructura:



o está unido a la amina N-terminal de la cadena A de la insulina, en la que
R₁ es (alquilo C₁-C₆)NH-R₉ o (alquilo C₁-C₆)NH-Si-R₉;

R₂ es H o alquilo C₁-C₆:

60 R₃ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₄, alquenilo C₃-C₈, (alquil C₀-C₄) (cicloalquilo C₄-C₆), (alquil C₀-C₄) (heterocíclico C₃-C₅), (alquilo C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀) o R₄ y R₃ junto con los átomos a los que están unidos formar un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros;

65 R₄ y R₈ se seleccionan independientemente del grupo que consiste de H, alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)SH, (alquilo C₂-C₃)SCH₃, (alquil C₁-C₄)CONH₂, (alquil C₁-C₄)COOH, (alquil C₁-C₄)NH₂, (alquil C₁-C₄)NHC(NH₂)⁺NH₂, (alquil C₀-C₄)(cicloalquilo C₃-C₆), (alquil C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (alquil C₀-C₄)(arilo C₆-

- C₁₀)R₇, (alquil C₁-C₄)(heteroarilo C₃-C₉), y alquilo C₁-C₁₂ (W₁) alquilo C₁-C₁₂, en el que W₁ es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, S y O, o R₄ y R₈ junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₆;
- R₁₀, R₁₁, R₁₂ y R₁₃ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, CH₃, (alquil C₁-C₄) COOH, (alquil C₁-C₄) NH₂, (alquil C₁-C₄) NHC(NH₂⁺)NH₂ y CH₂(C₃-N₂ heterocíclico);
- 5 R₅ es NHR₆ u OH;
- R₆ es H o alquilo C₁-C₈;
- R₇ se selecciona del grupo que consiste en H, OH, alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, (alquil C₀-C₄) NH₂ y (alquil C₀-C₄) OH;
- 10 R₉ se selecciona del grupo que consiste en acilo C₂₀-C₃₀; y
S₁ es un enlace o un espaciador que consiste de uno a seis aminoácidos, en el que dicho espaciador comprende una o más aminoácidos cargados seleccionados del grupo que consiste en ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteíco, arginina y lisina.
- 15 10. Conjugado de la reivindicación 1, en el que el péptido de incretina comprende la secuencia X_iX₂EGTFTSDX₆ SSYLEEQAAKEFIAWLVK-R₄ (SEQ ID NO: 1936), o X₁X₂QGTFTSDYSKYLDERX₅AKDFVX₃WLMN-R₄ (SEQ ID NO: 1937)
en el que
- 20 X_i = His, D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina o ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA) Nmetilhistidina, alfa-metilhistidina o ácido imidazol acético,
X₂ = Ser, D-serina, Ala, Val, glicina, N-metil serina o ácido aminoisobutírico (AIB), N-metil alanina o D-alanina;
X₃ = Ala, Gln o Cys-PEG;
R₄ = Thr-CONH₂ o Cys-PEG o GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 515), GGPSSGAPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516) o GGPSSGAPPSCK(rEC16)C (SEQ ID NO: 1935)
- 25 X₅ = Ala o Arg y
X₆ = valina, tirosina o K(rEC16)C
en el que, cuando X₃ es Cys-PEG, X₄ no es Cys-PEG o GGPSSGAPPSC-PEG (SEQ ID NO: 516), y cuando X₂ = Ser, X₁ no es His.
- 30 11. Conjugado de la reivindicación 1, en el que el péptido de incretina comprende la secuencia de HAEGTFTSDVSSYLEQAAREFIAWLVRGRG (SEQ ID NO: 700), HAEGTFTSDVSSYLEQAAKEFIAWLVKGRG (SEQ ID NO: 703), HAEGTFTSDVSSYLEQAAKEFICWLVKGR (SEQ ID NO: 717) HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 701) o HSQGTFTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT (SEQ ID NO: 699), opcionalmente con cualquiera de SEQ ID NO: 703), (SEQ ID NO: 717), (SEQID NO: 701) o (SEQ ID NO: 699) que comprende además una extensión terminal de una secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 820) o GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096).
- 35 12. Composición farmacéutica que comprende un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 o 10-11 o el derivado de la reivindicación 9, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 13. Conjugado de la composición de la reivindicación 12, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la diabetes.

Insulin Receptor Activity of GLP-1/Insulin (DPG) fusion

HAE¹GTTSDVSSYLE²QAAREFIAWLVRGRG-GPENLCGA³NLVCGDRGFYFNDRGAGSSSSRRGIVDECC⁴NRSCLRRLENYCN

Fig. 1A:

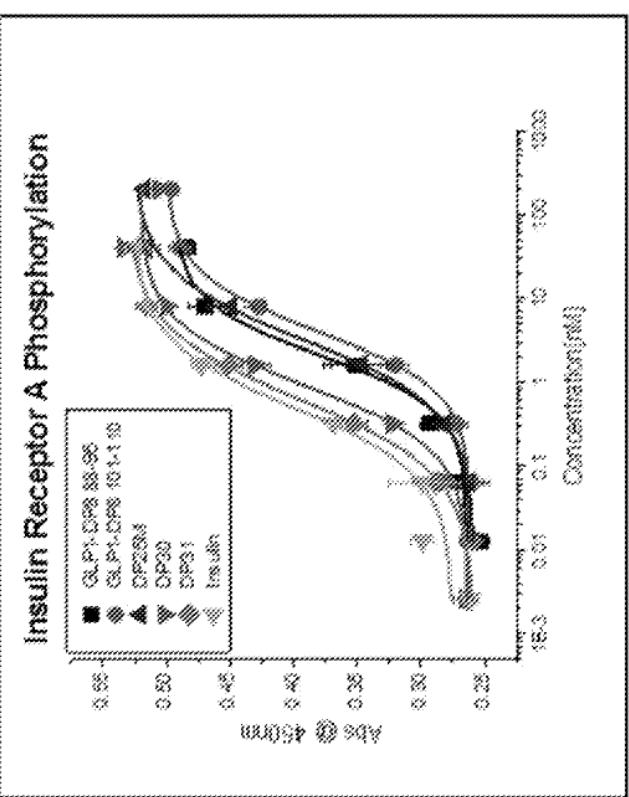


Fig. 1B:

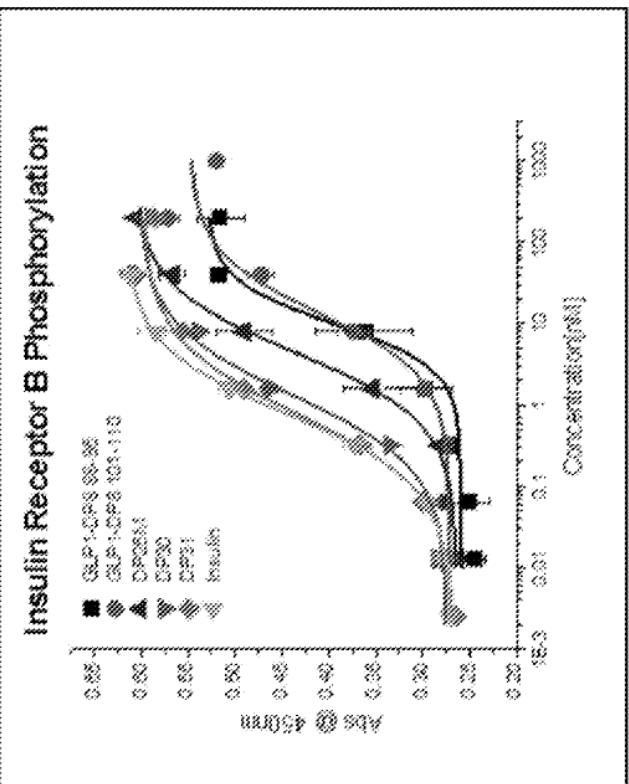
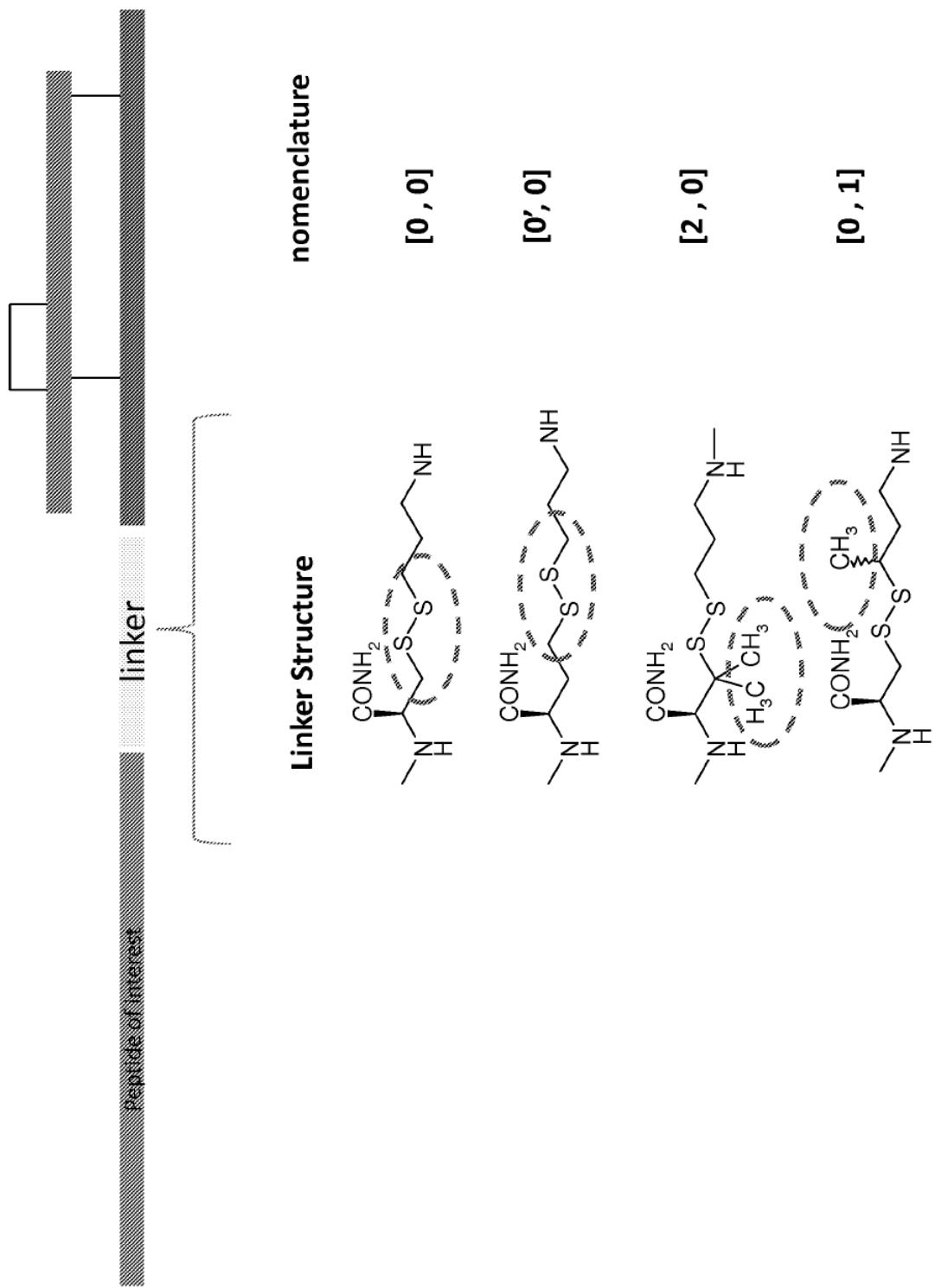


Fig. 1A:
Insulin Receptor B Phosphorylation

Fig. 1B:
Insulin Receptor A Phosphorylation

Fig. 2: Single Molecule incretin/insulin Co-agonists

**Fig. 3: Additional Single Molecule
incretin/insulin Co-agonists**

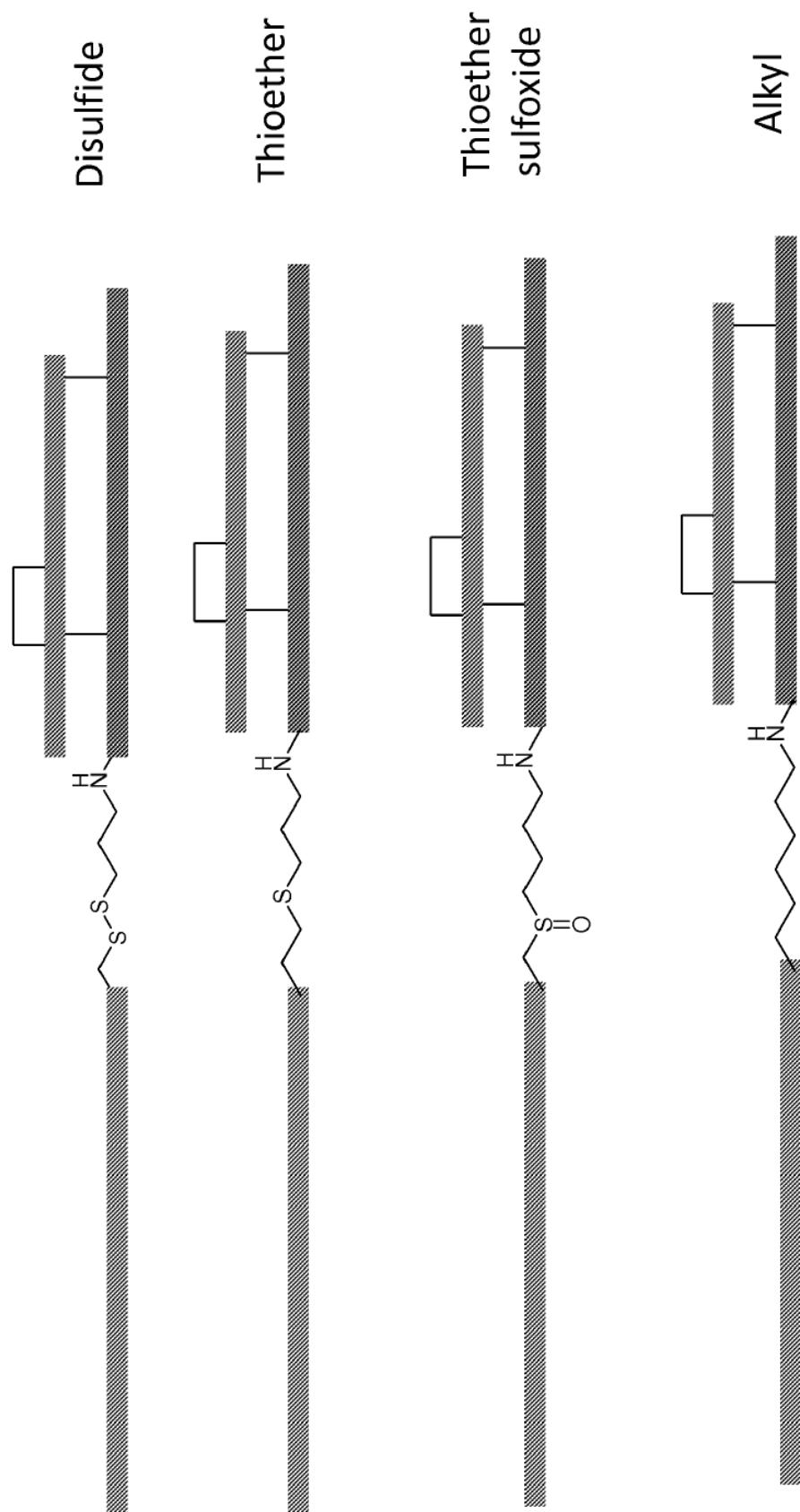
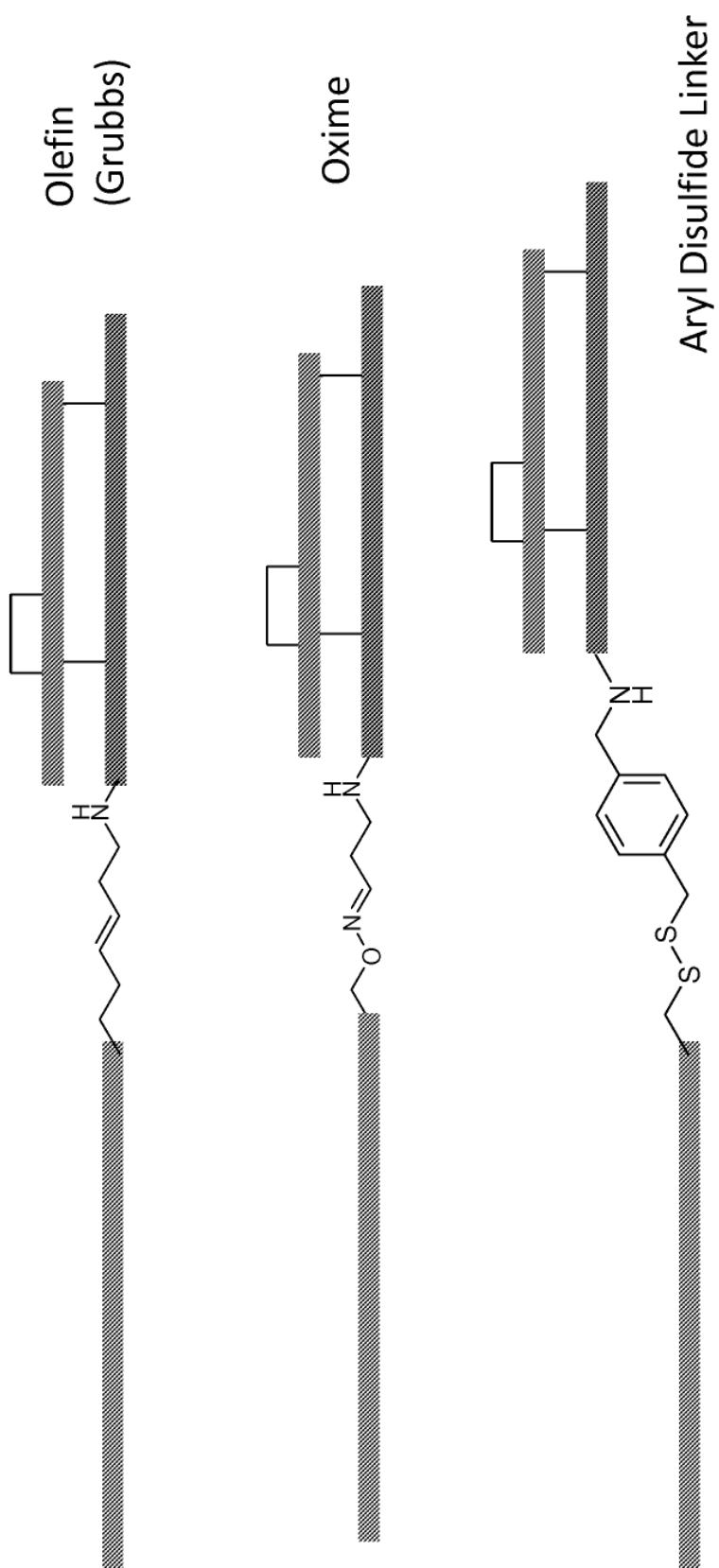


Fig. 3 cont. Additional Single Molecules
incretin/insulinCo-agonists



Synthesis of Incretin Co-agonists

Fig. 4A

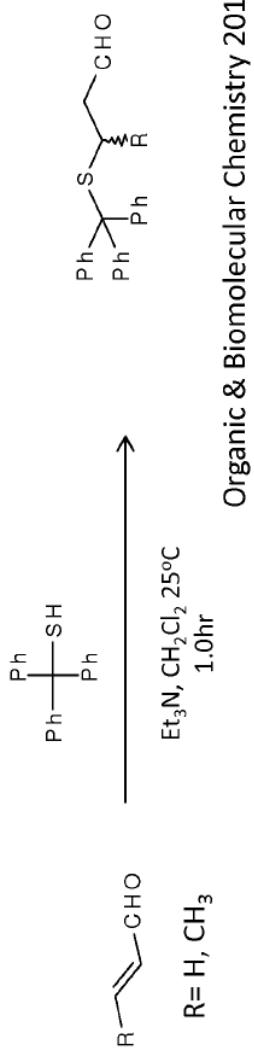
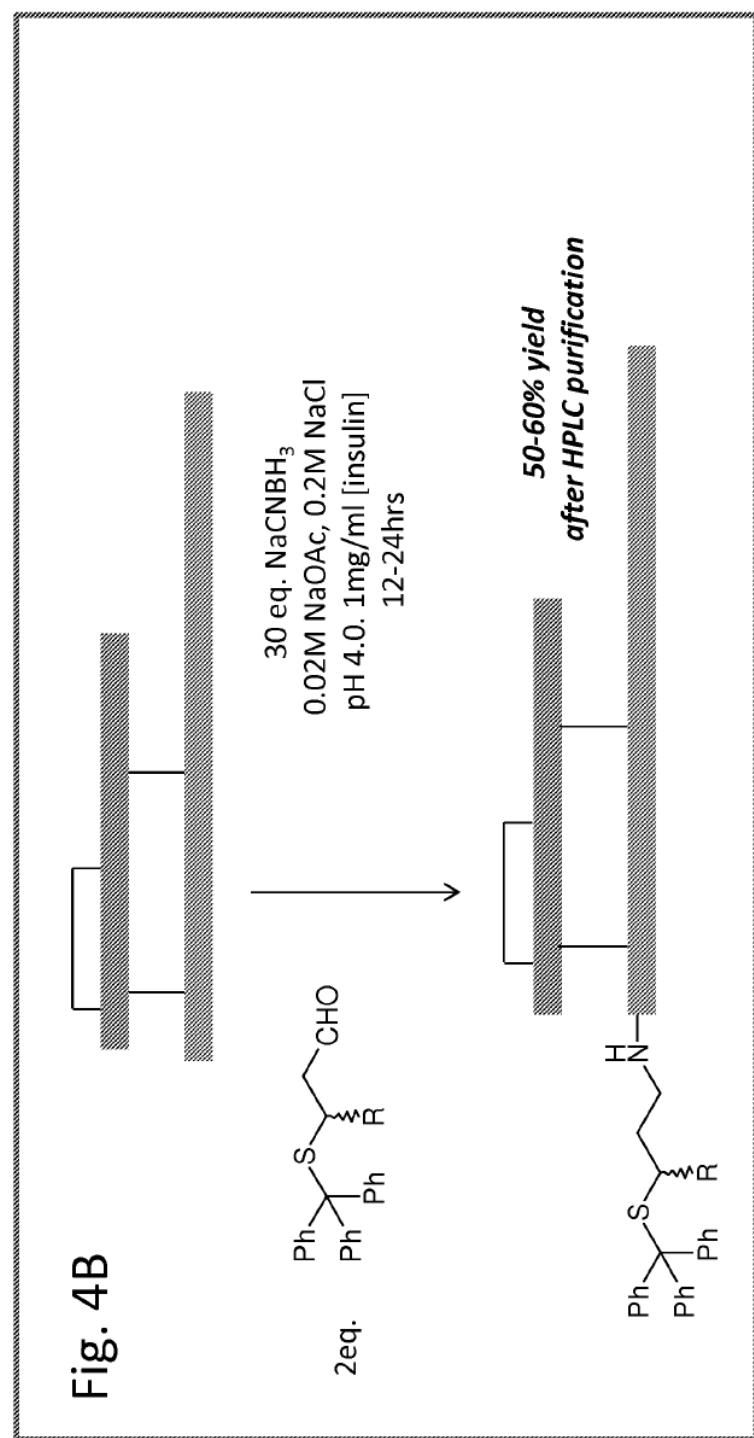
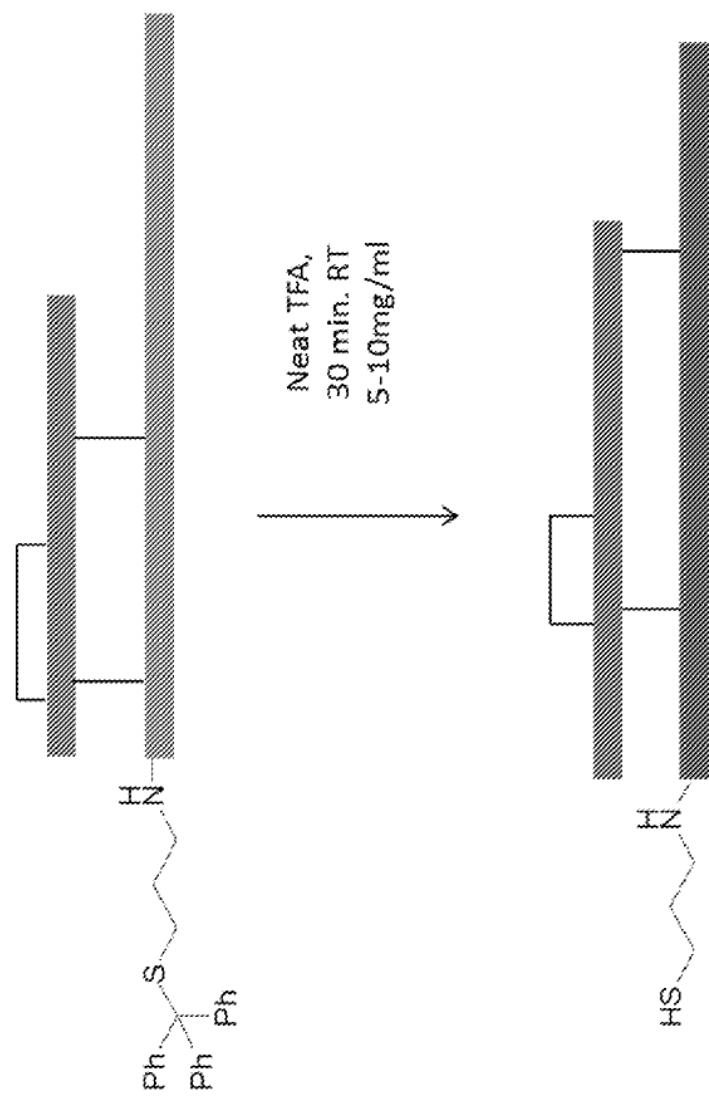


Fig. 4B



Synthesis of Incretin Co-agonists

Fig. 4C



Synthesis of Incretin Co-agonists

Fig. 4D

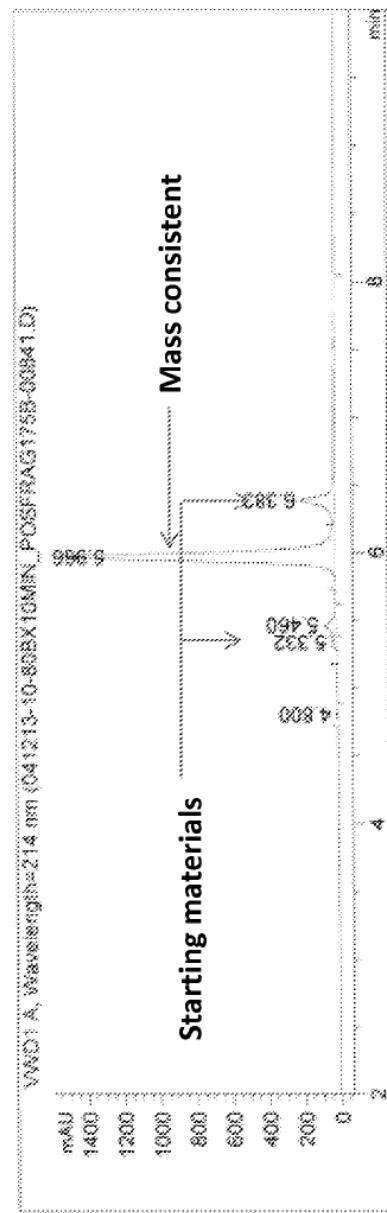
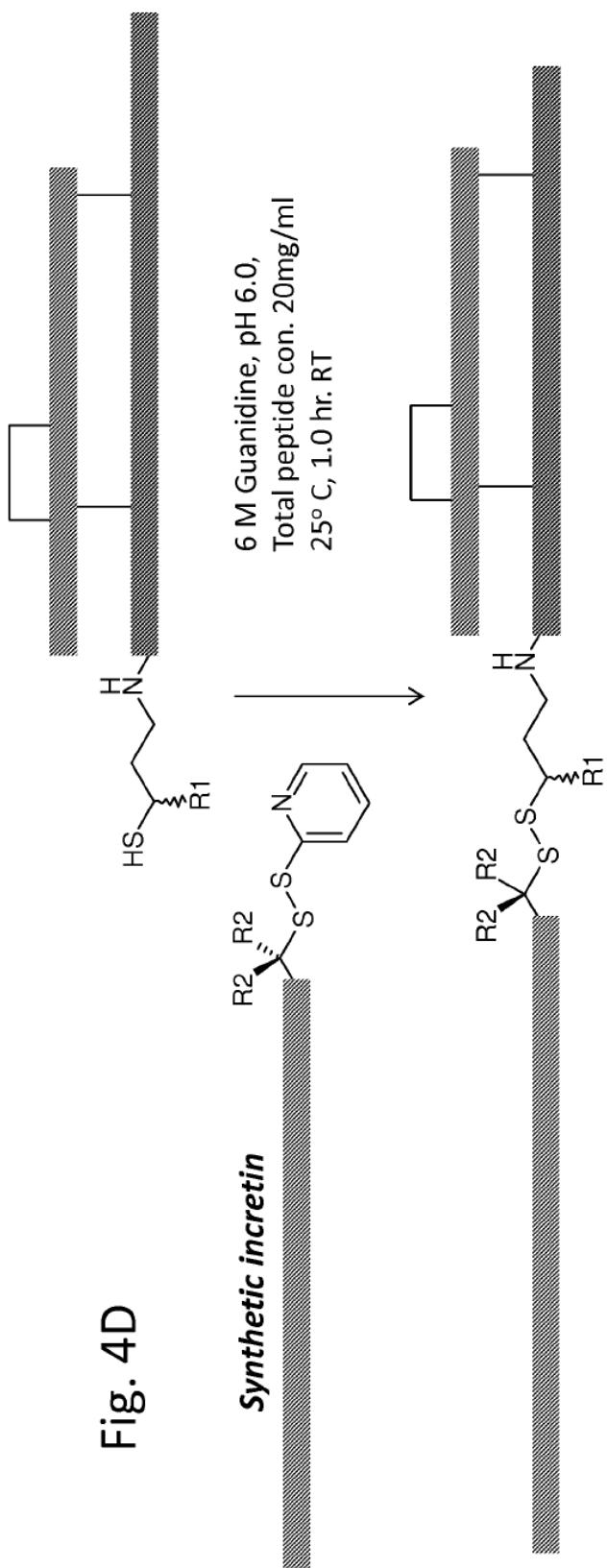
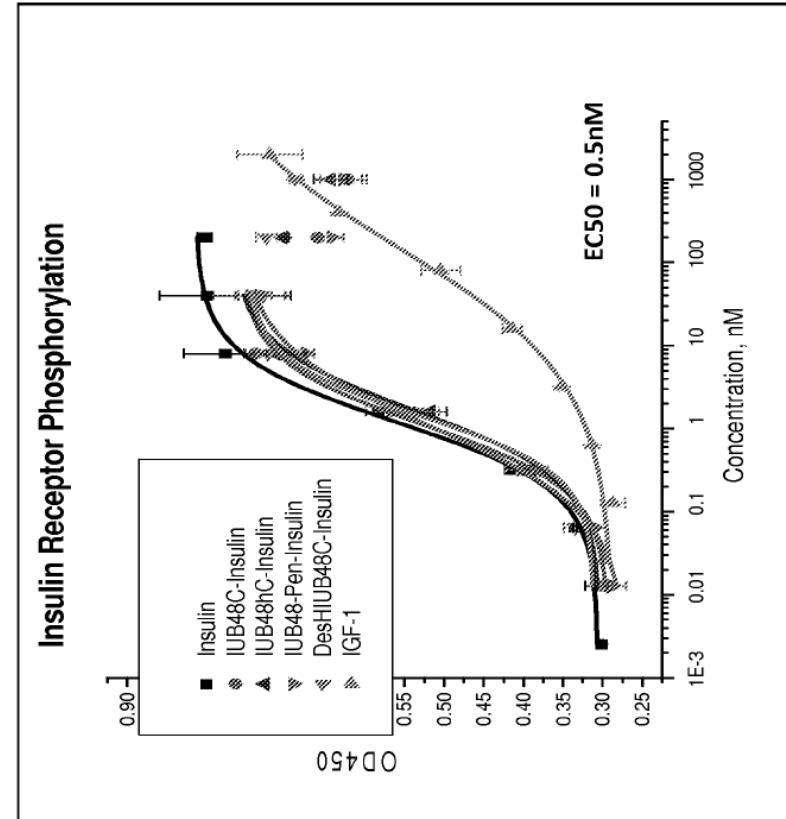
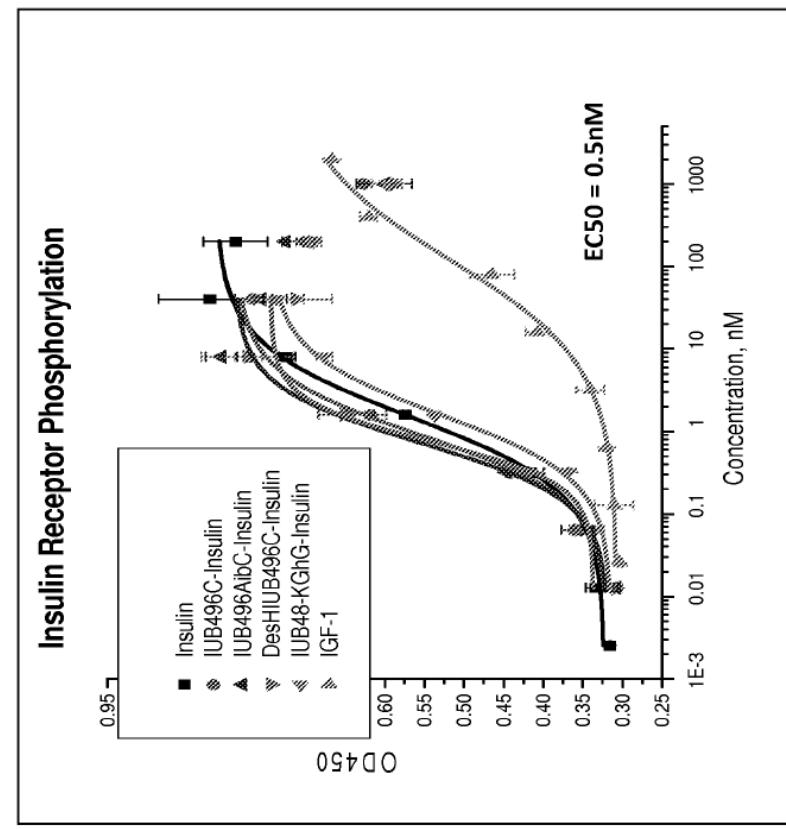


Fig. 5A & 5B: Insulin Receptor Isoform B Bioactivity of Incretins**Fig. 5A****Fig. 5B**

HXEGTFTSDVSSYILEQAAKEFIAWLVKGIGPSSGAPPPS
 C (S--S) CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin

HSQTFTSDSKYLDSSRAQDFVQWLMNTGSSGAPPPS
 C (S--S) CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin

glucagon increlin

GLP incretin

GLP-1 & Glucagon Receptor Bioactivity of Increlins

Fig. 6A GLP-1 Receptor

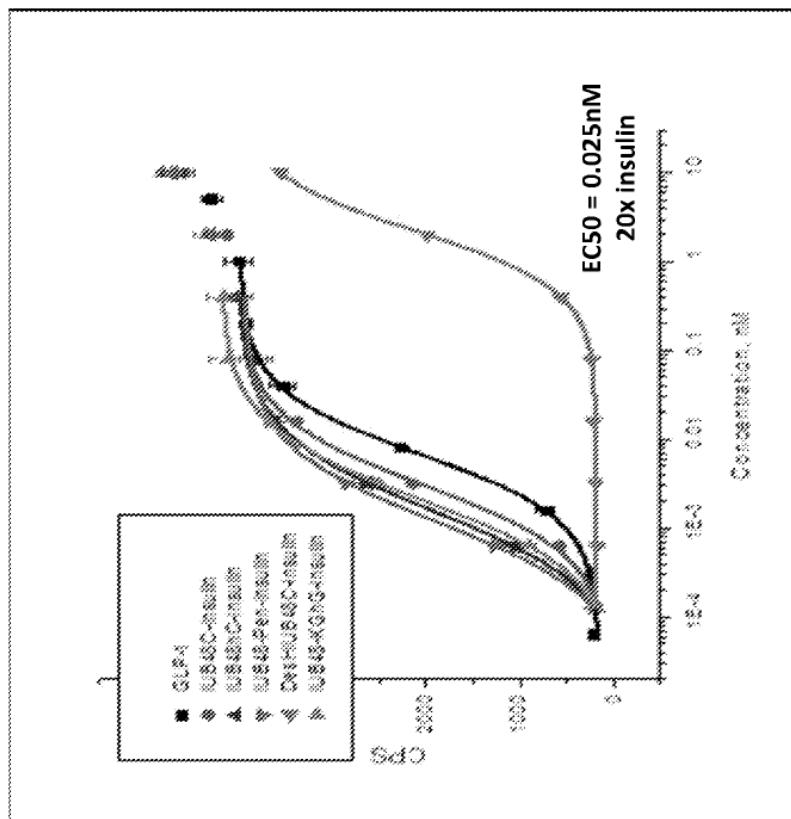
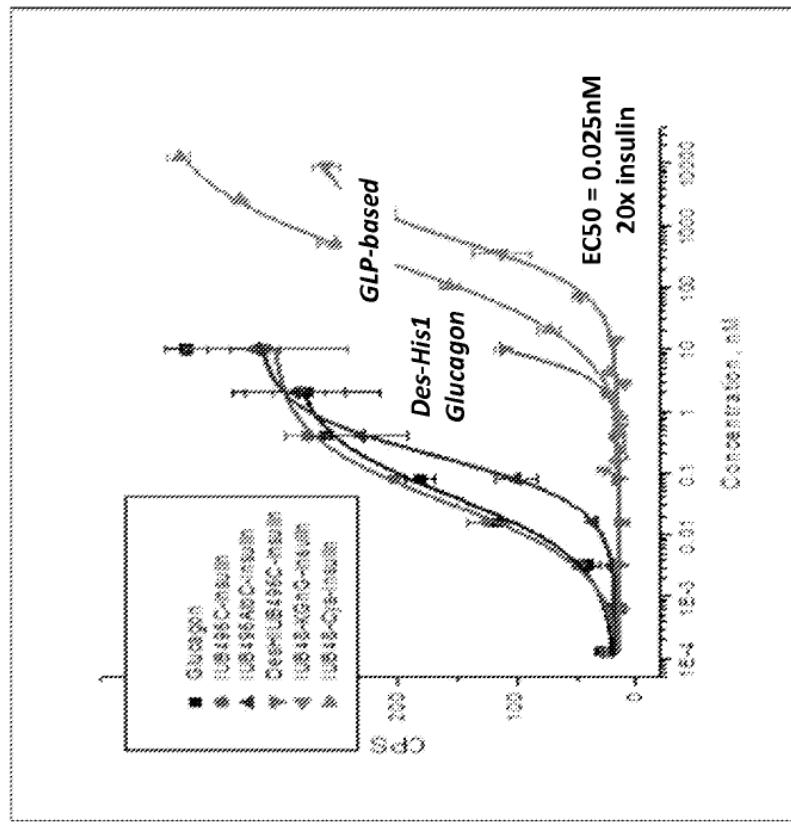


Fig. 6B Glucagon Receptor



HSEGTFTSDVSSYLEQQAAKEFIAWLIVKGDPSSGAPPPS
C(=S~S)CH2CH2CH2-B1Insulin

GLP increlin

HSOTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNTGSSGAPPPS
C(=S~S)CH2CH2CH2-B1Insulin

glucagon increlin

Relative Ex Vivo Stability in Diluted Plasma

Fig. 7

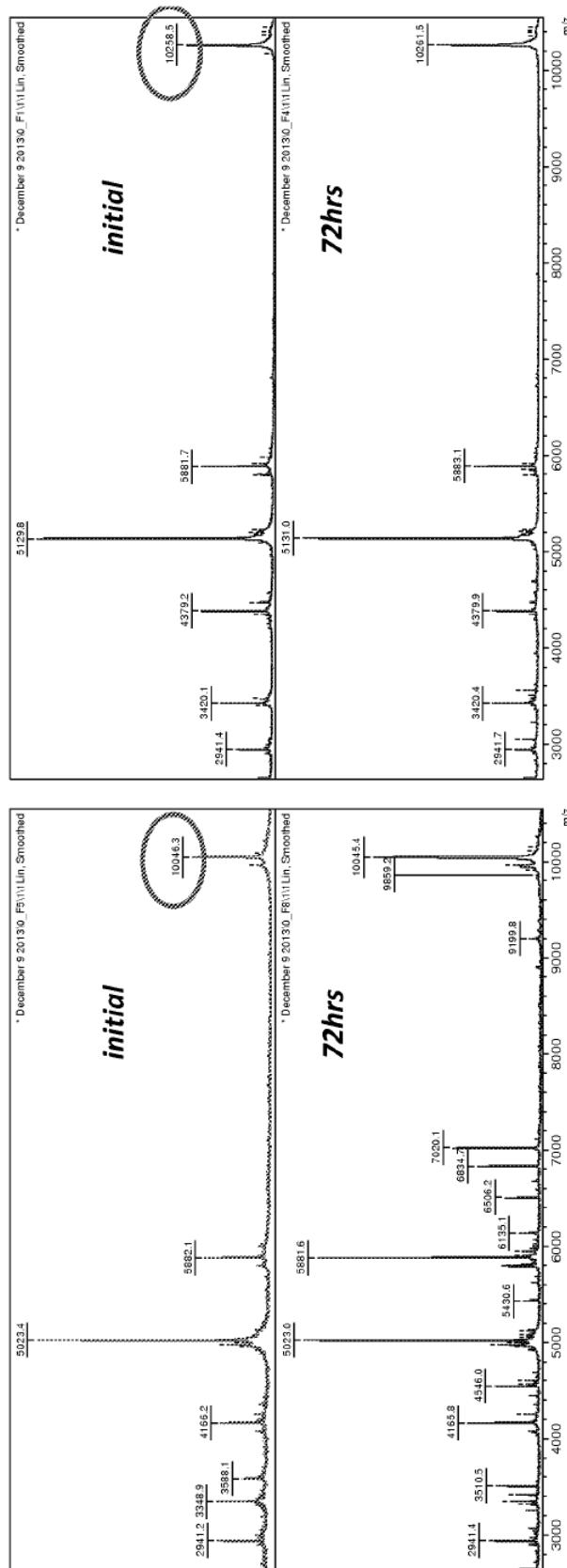
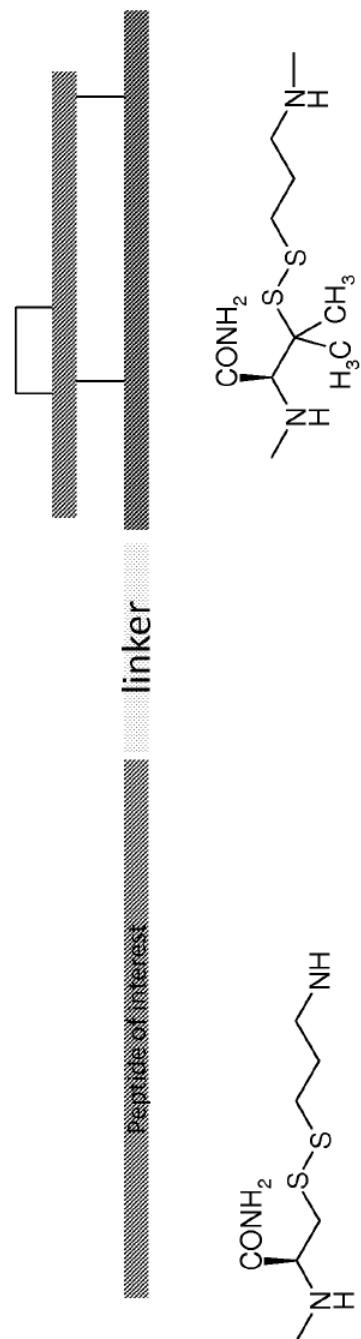
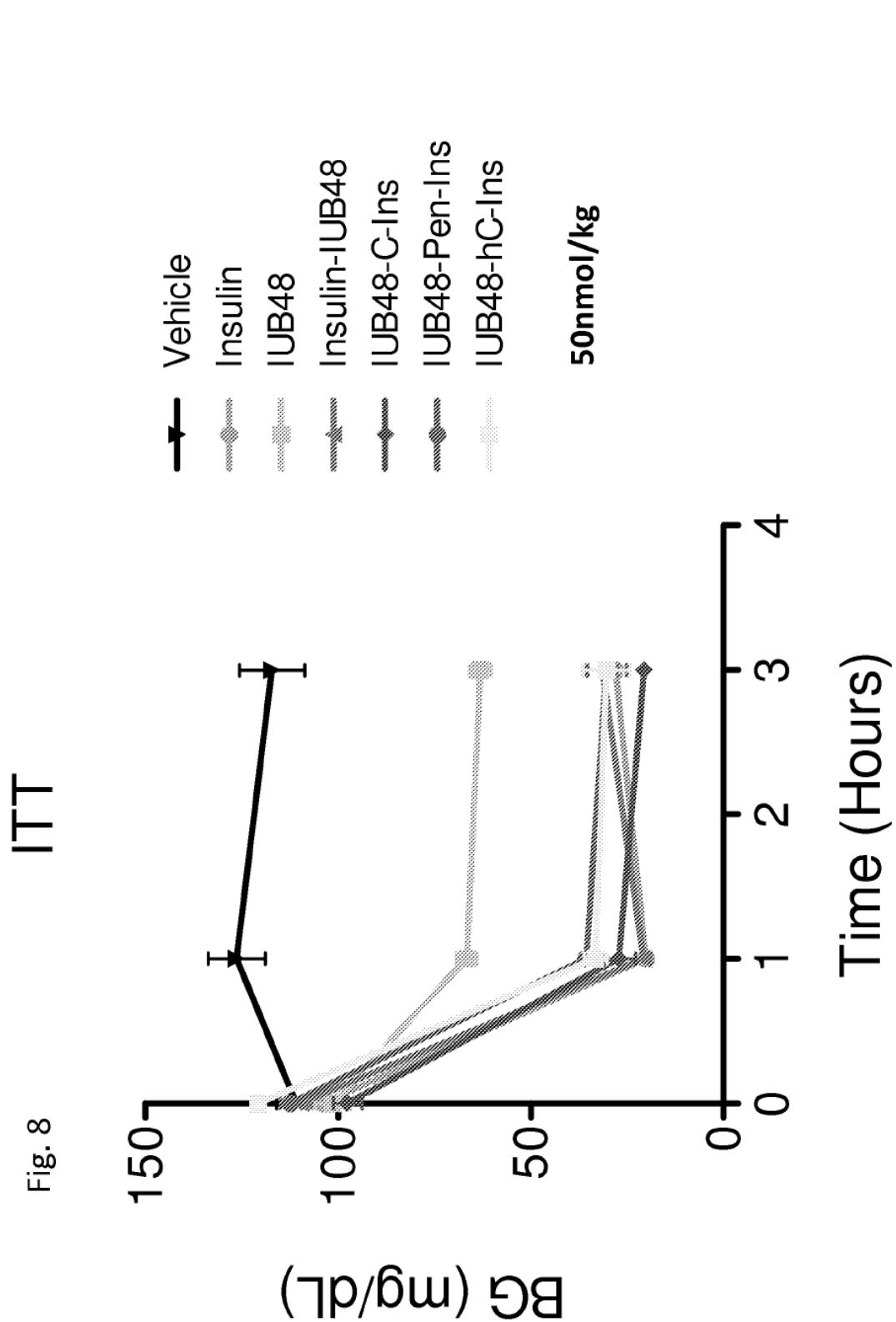
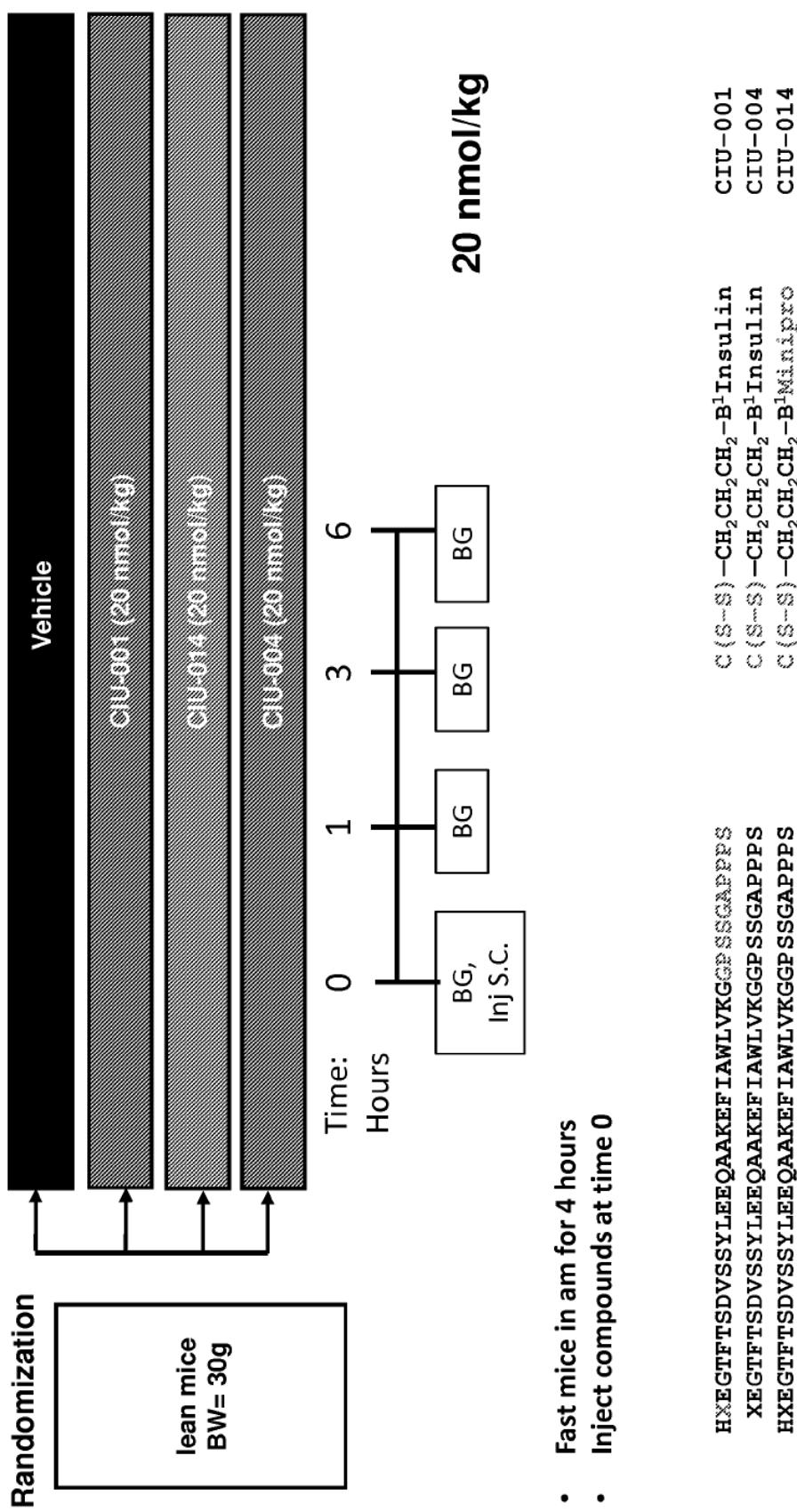


Fig. 8



GLP-based Incretins Chemical "Knockouts"

Fig. 9A



**GLP-based increllins
Chemical "Knockouts"**

Fig. 9B

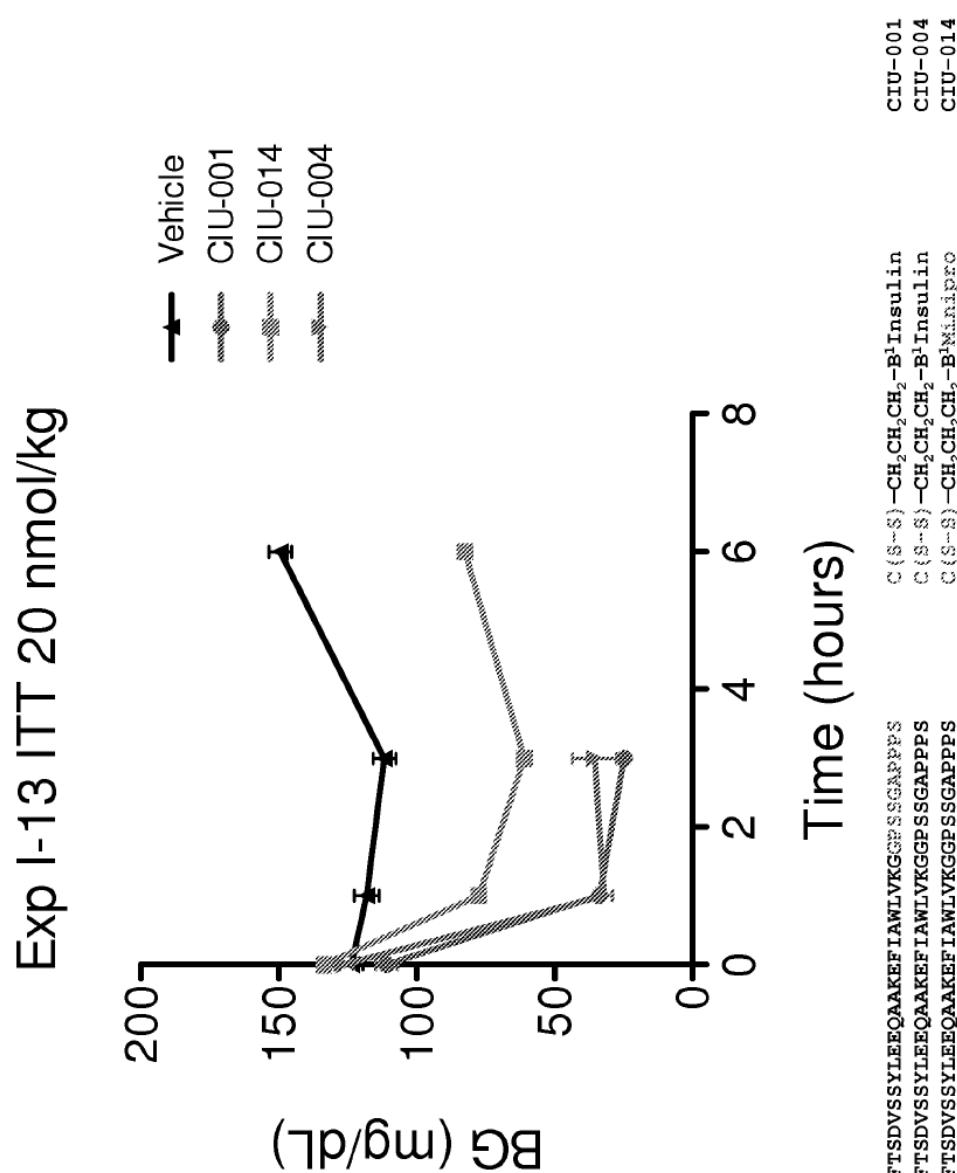


Fig. 10A: Assembly of a Sustained Duration Analog

HXEGTFTSDVSSYLEQQAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSXC (S-S)-CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin

HXEGTFTSDVSSYLEQQAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSC (S-S)-CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin

HXEGTFTSDVSSYLEQQAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSC (S-S)-CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin-X (LyssB29)

HXEGTFTSDVSSYLEQQAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSXC (S-S)-CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin

HXEGTFTSDVSSYLEQQAREFIAWLVRGGPSSGAPPPSXC (S-S)-CH₂CH₂CH₂-B¹Insulin-X (LyssB29)

Incretin X₁₀ or 40 or Insulin B²⁹ can be pegylated (10 or 20kd), or γE-C16

*Fig. 10 B: Assembly of Lipidated Incretin Analogs
(cIU-13, -20, -22, -32)*

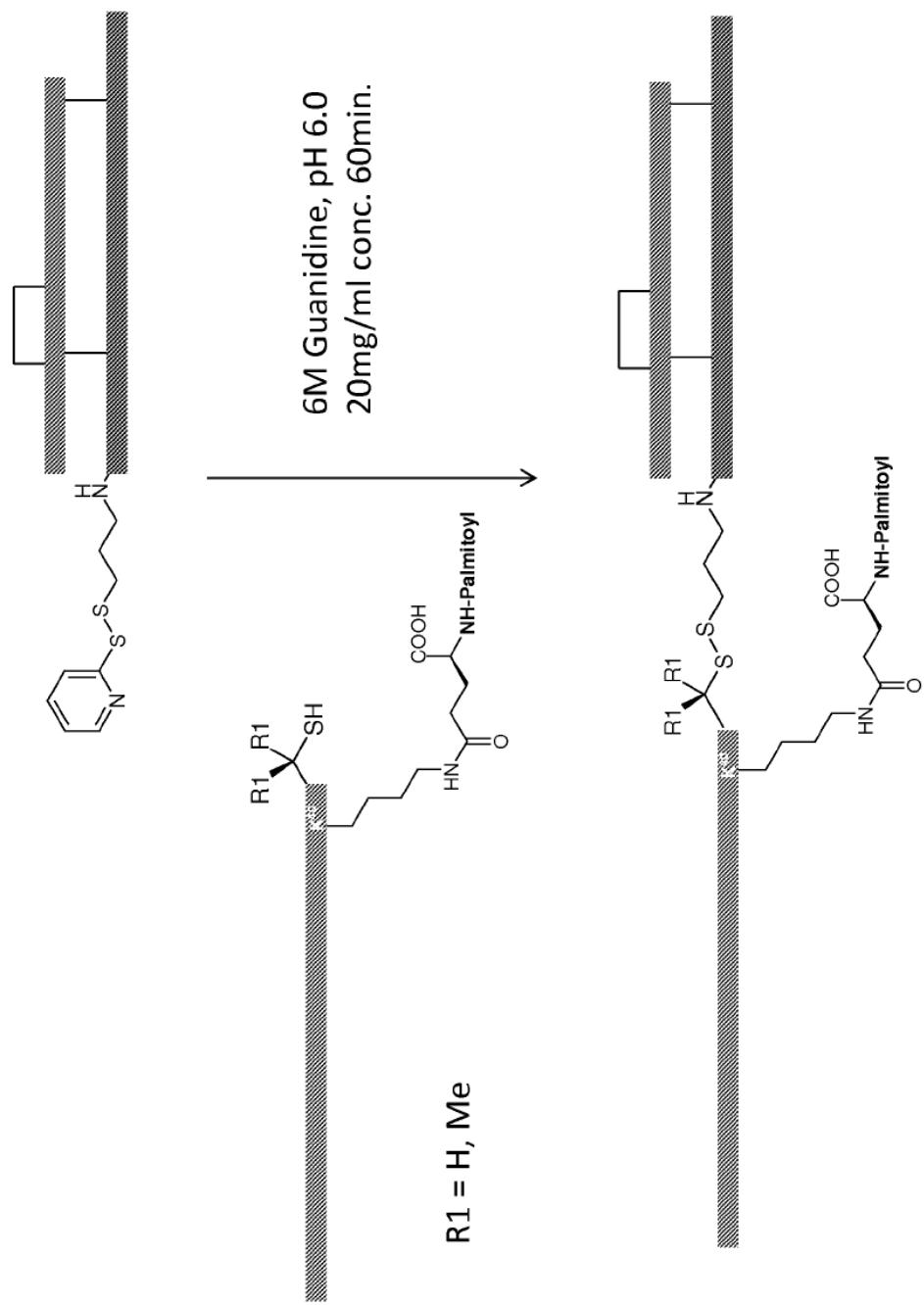


Fig. 10C: Assembly of Singly PEGylated Increllin Analogs (CIU-37)

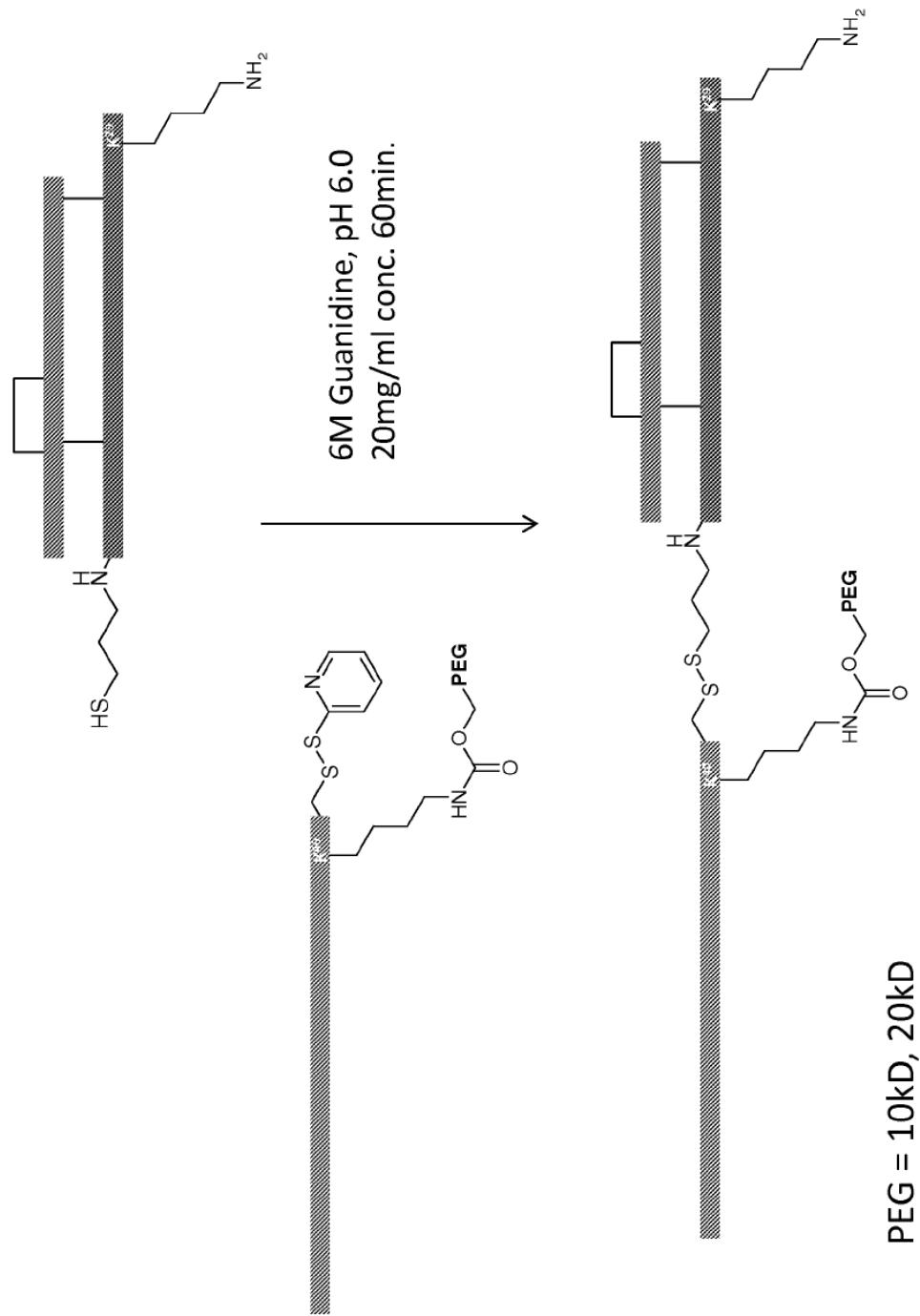
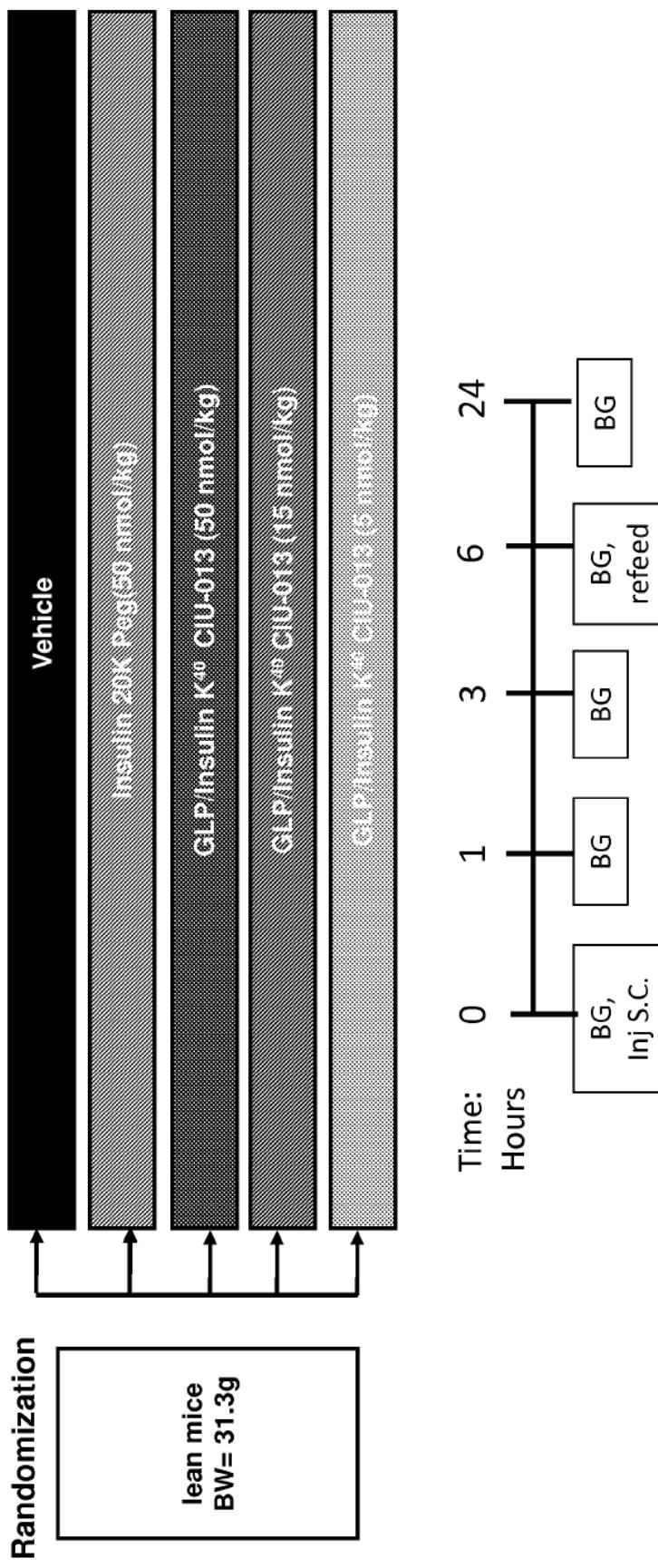


Fig. 10 D: Increlin Assay Results



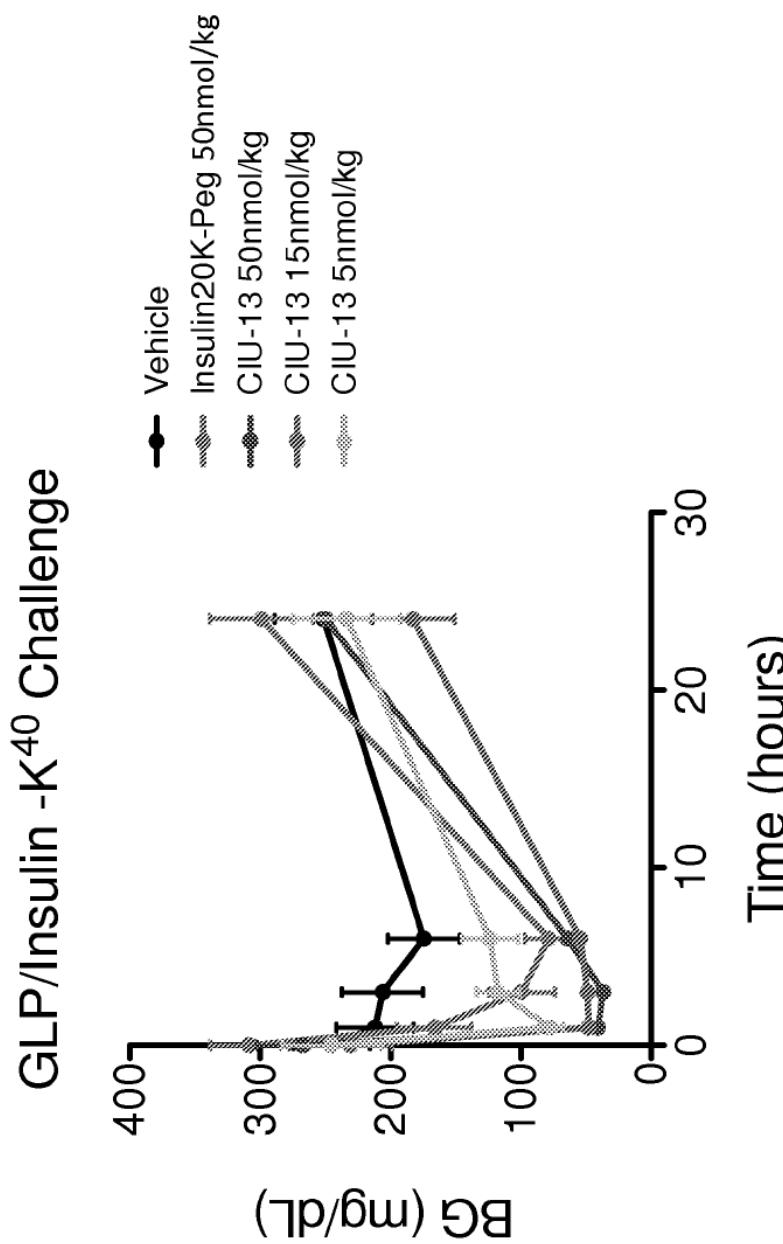
Fig. 11A: GLP-based Lipidated increlin

- Fast mice in am for 4 hours
- Inject compounds at time 0

HSEGTTFTSDVSSYLEQQAAKEFIIAWLVKGGPSSGAPPSUC (S--S)–CH₂CH₂CH₂–B¹Insulin CIU-013

X = Aib & U = K(rEC16)

Fig. 11B GLP-based Incretin



H³EGTFTSDVSSYLEQQAAKEFIAWLVKGPSGK(rEC16)C(S-S)—CH₂CH₂CH₂•B1Insulin

Fig. 11C *GLP-based Incretin*

Baseline-corrected of GLP/Insulin Challenge

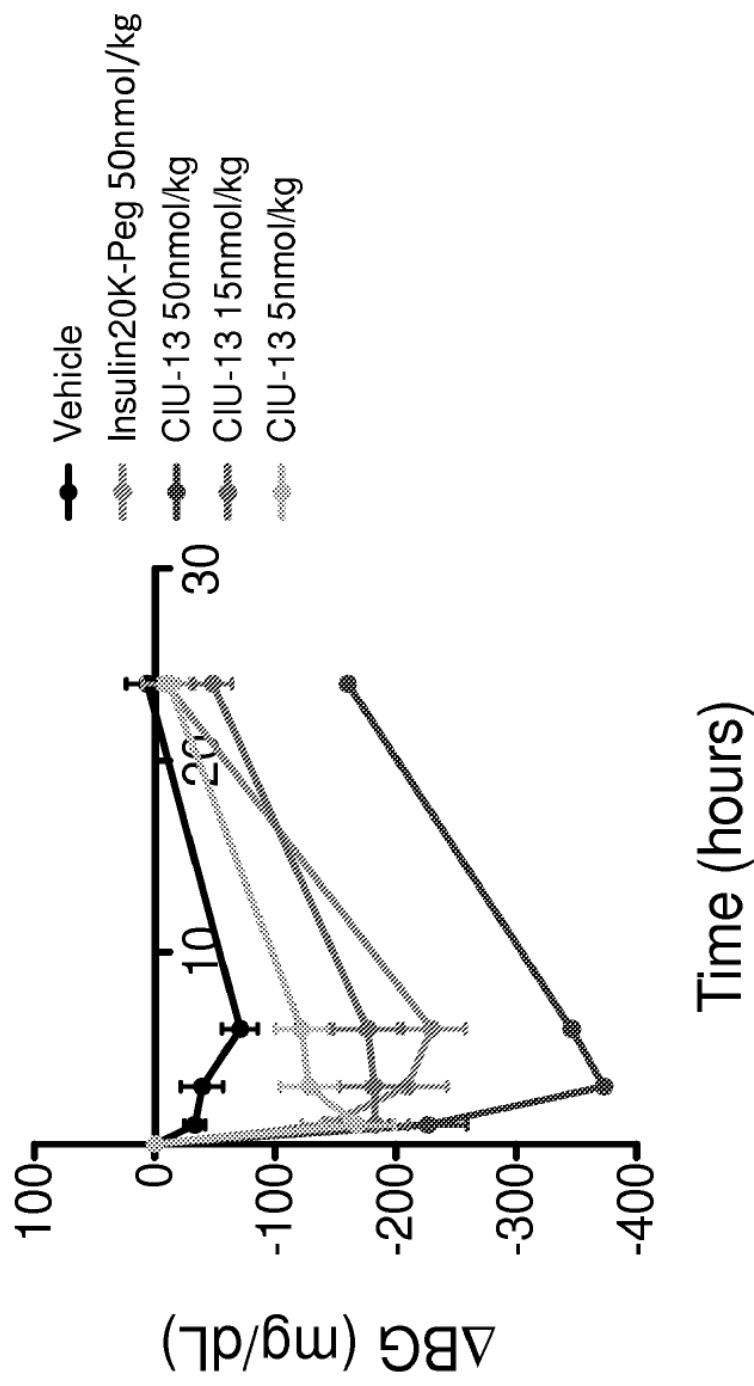
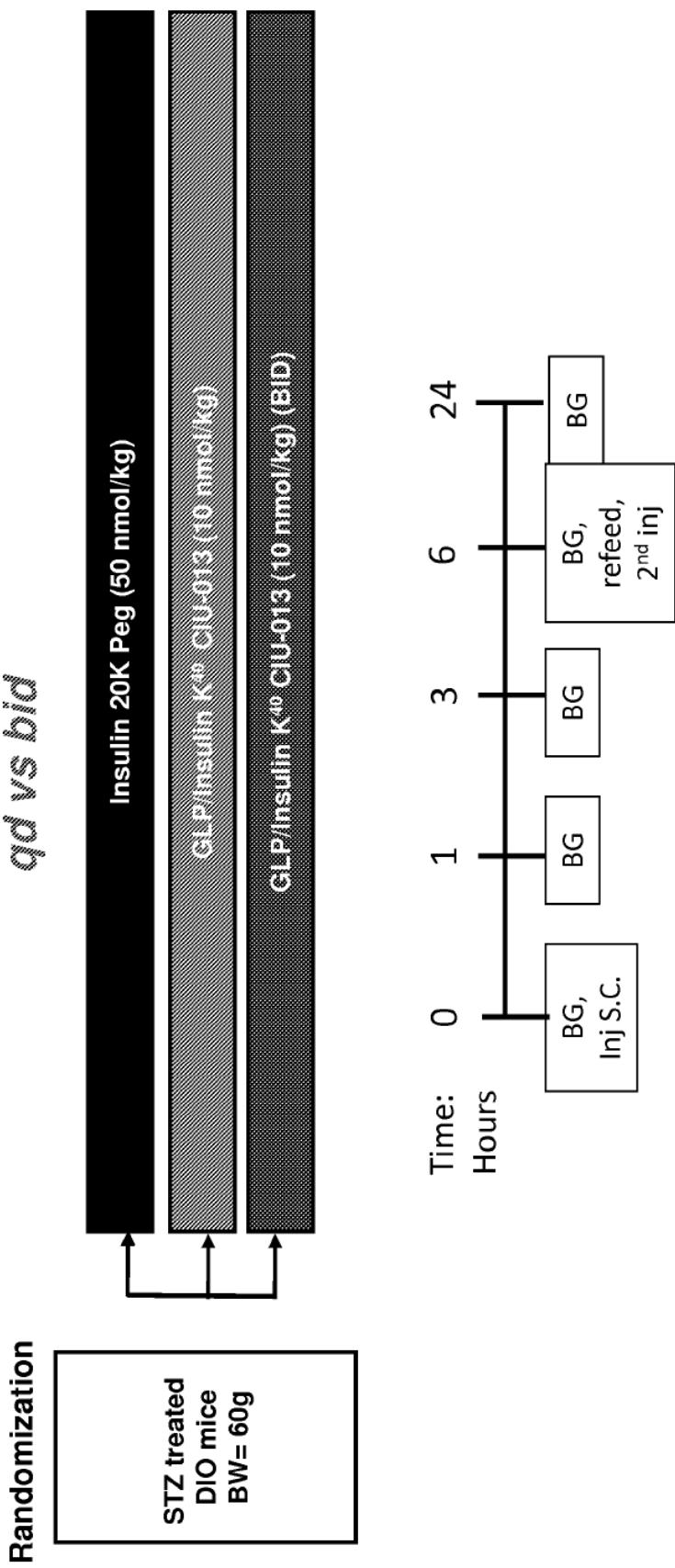


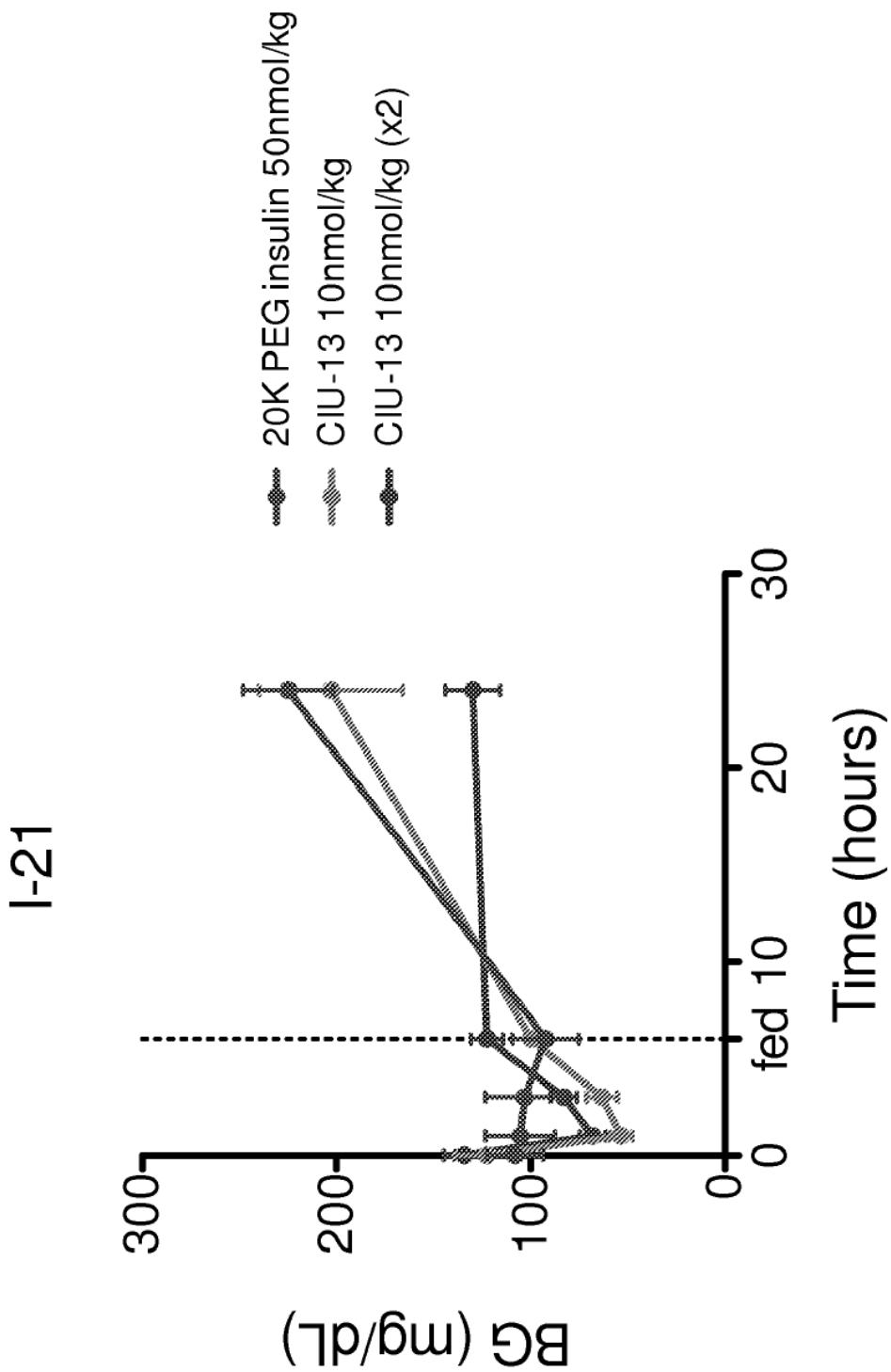
Fig. 12A: GLP-based Incretin



- Fast mice in am for 3 hours
- Inject compounds at time 0 (about 24hr post previous 100nmol/kg insulin inj)
- 2nd dose of CIU-13 10nmol/kg or vehicle injected after 6hr
- Mice re-fed after 6hr, FI measured at 24hr

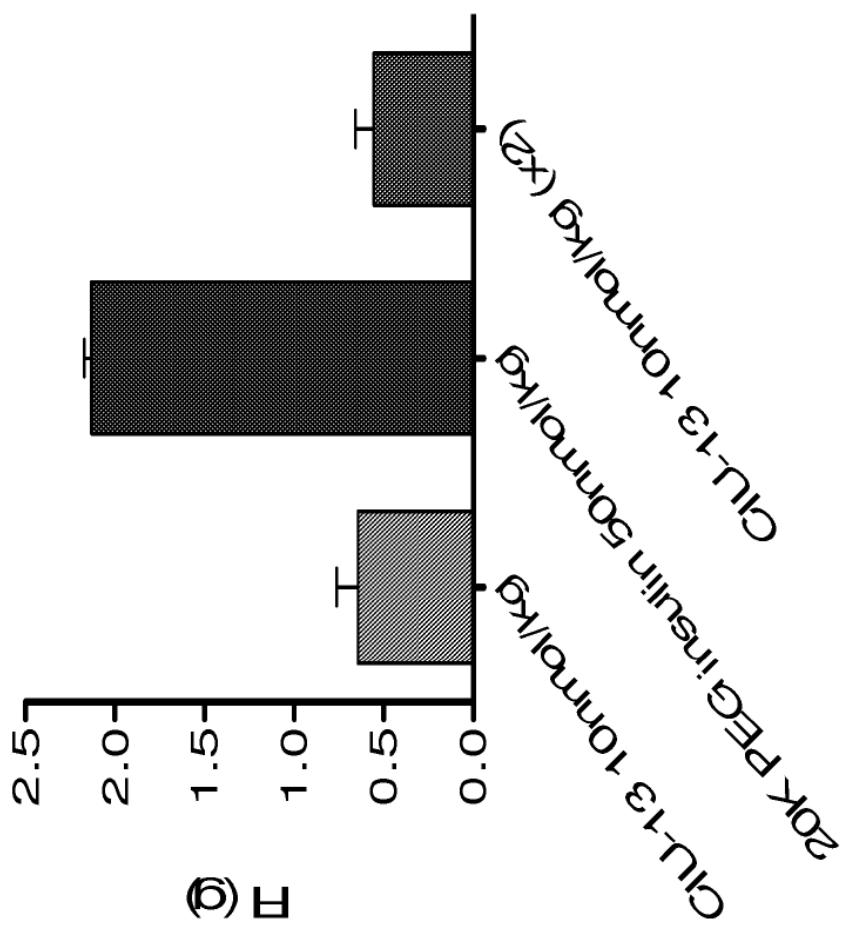
H₃EGTFTSDVSSYLEQQAAKEFIQAWLVKGPPSSGAPPPSUC (S-S)-CH₂CH₂-B¹Insulin CIU-013
 X = Aib & U = K (rEC16)

**Fig. 12B: GLP-based Incretin
qd vs bid**



*Fig. 13: GLP-based Incretin
qd vs bid*

Food Intake between 6 and 24hr



**Fig. 14A: GLP-based Incretin
qd vs bid**

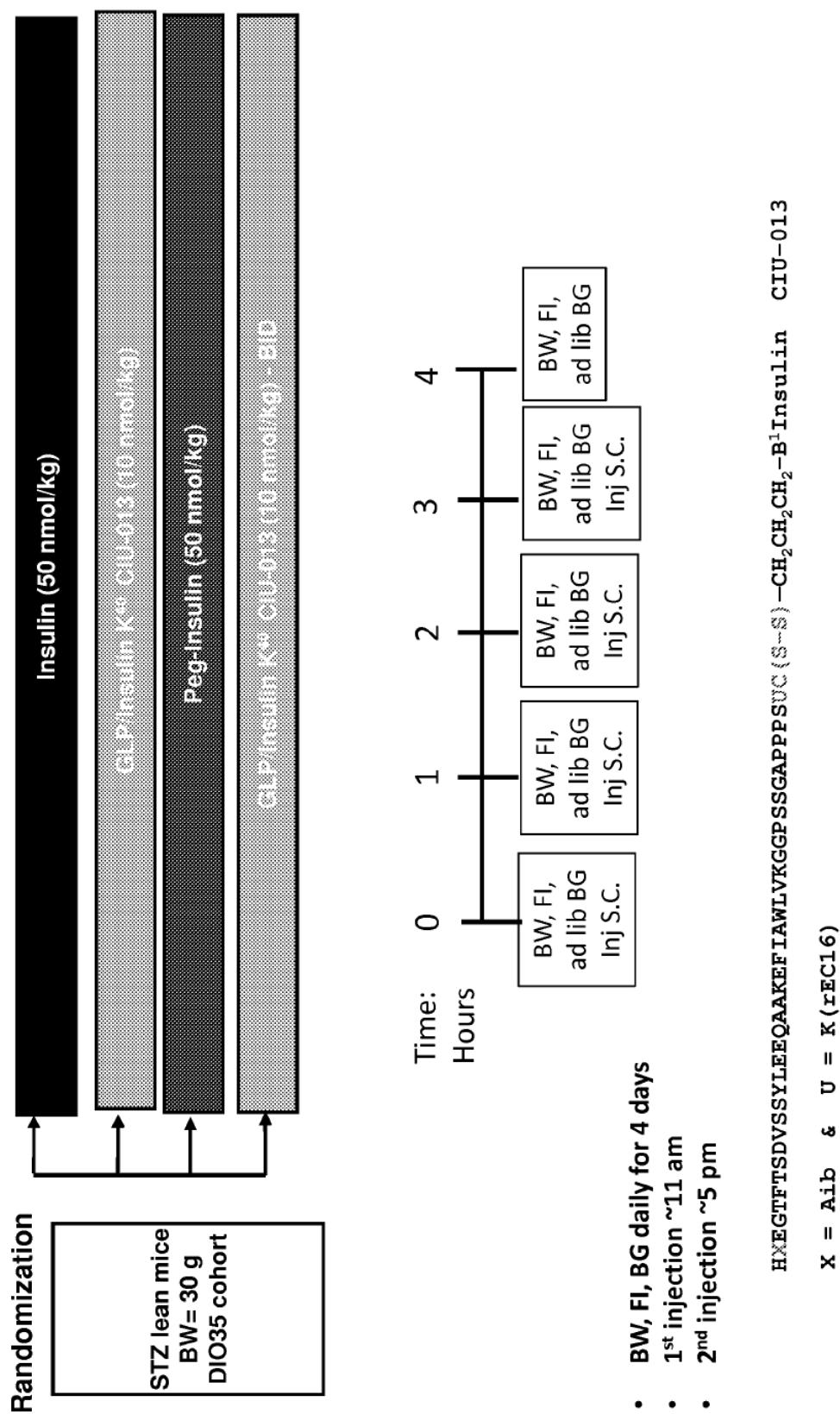
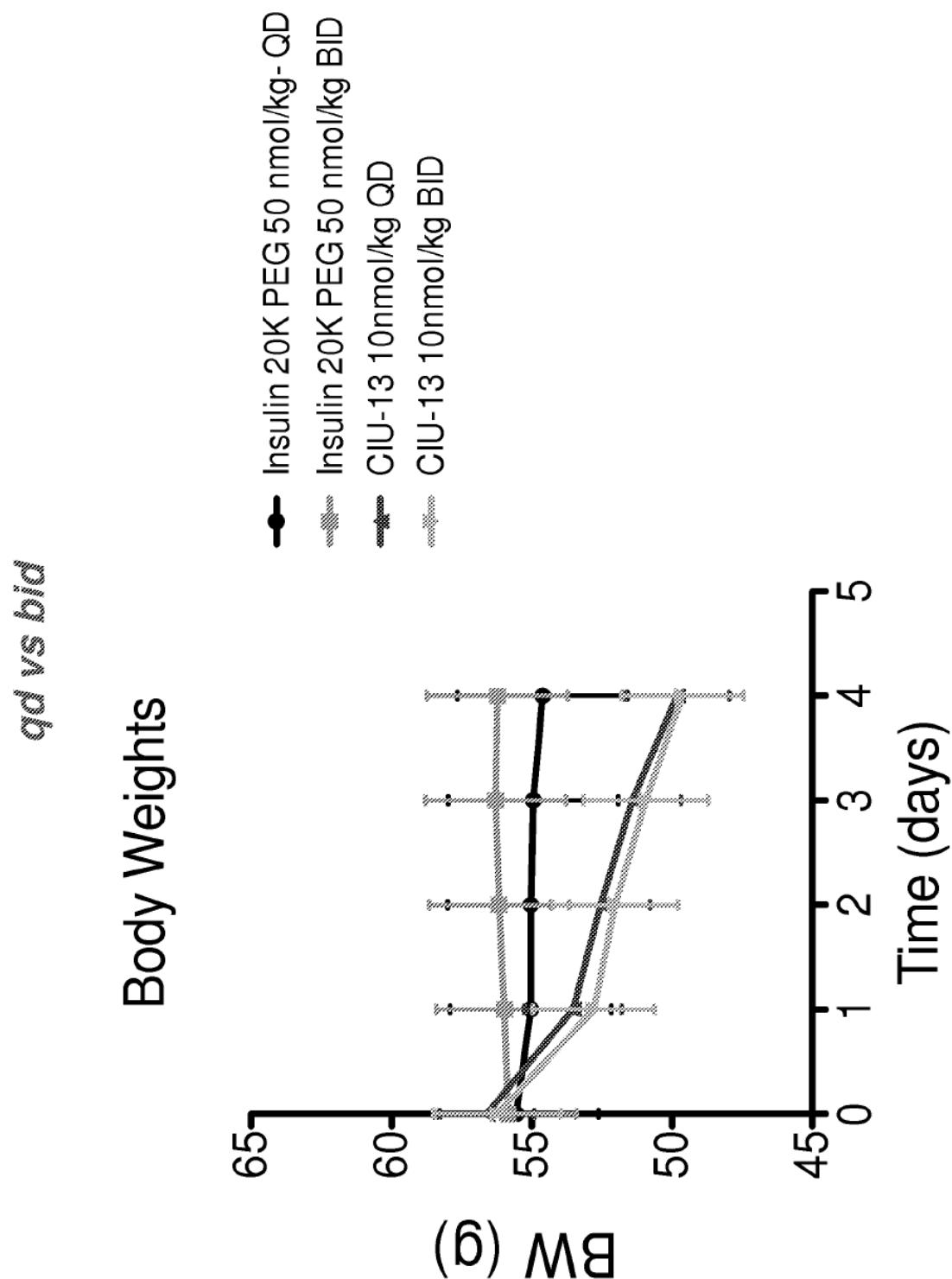


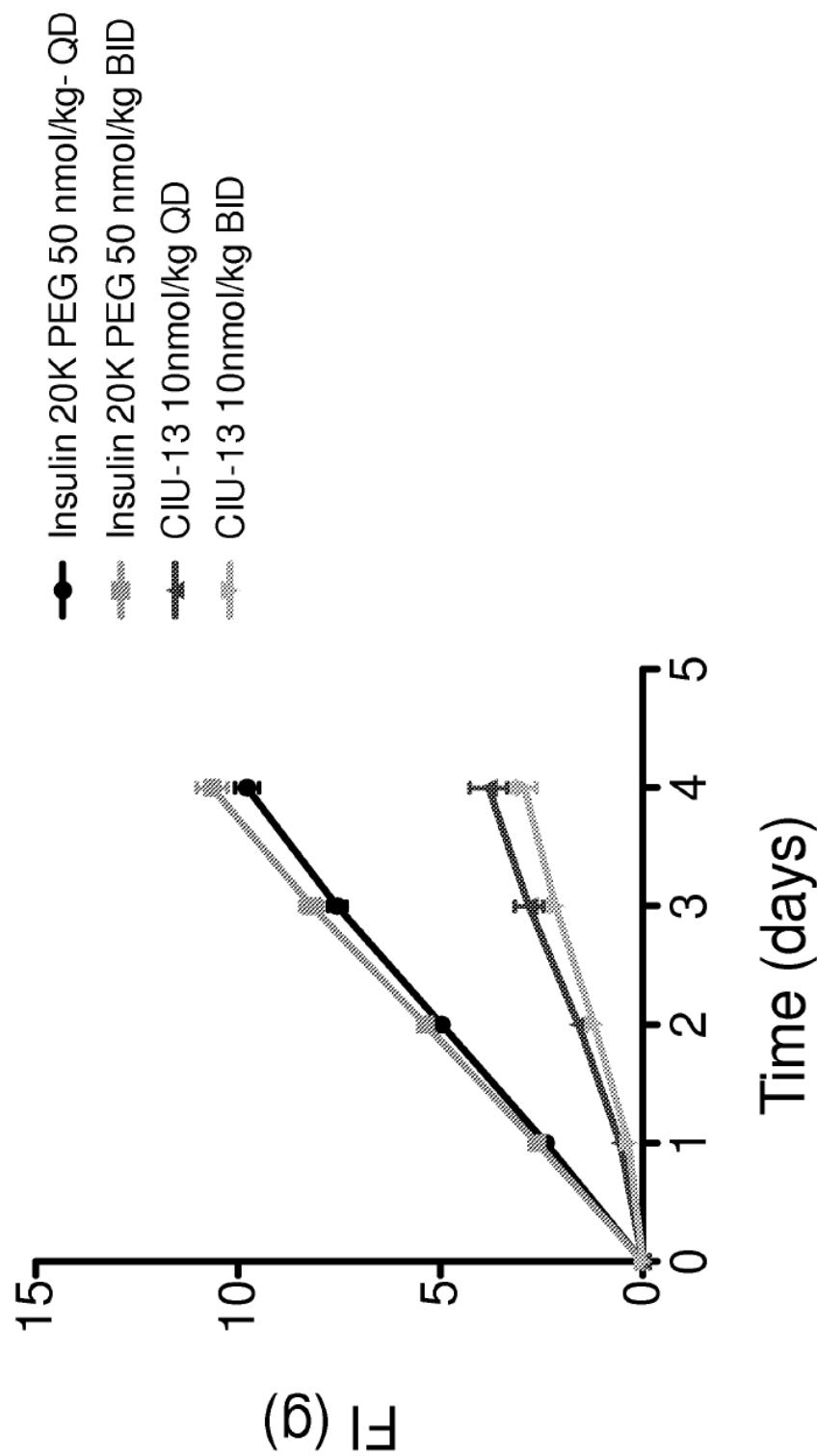
Fig. 14B: GLP-based Incretin



GLP-based Incretin

qd vs bid

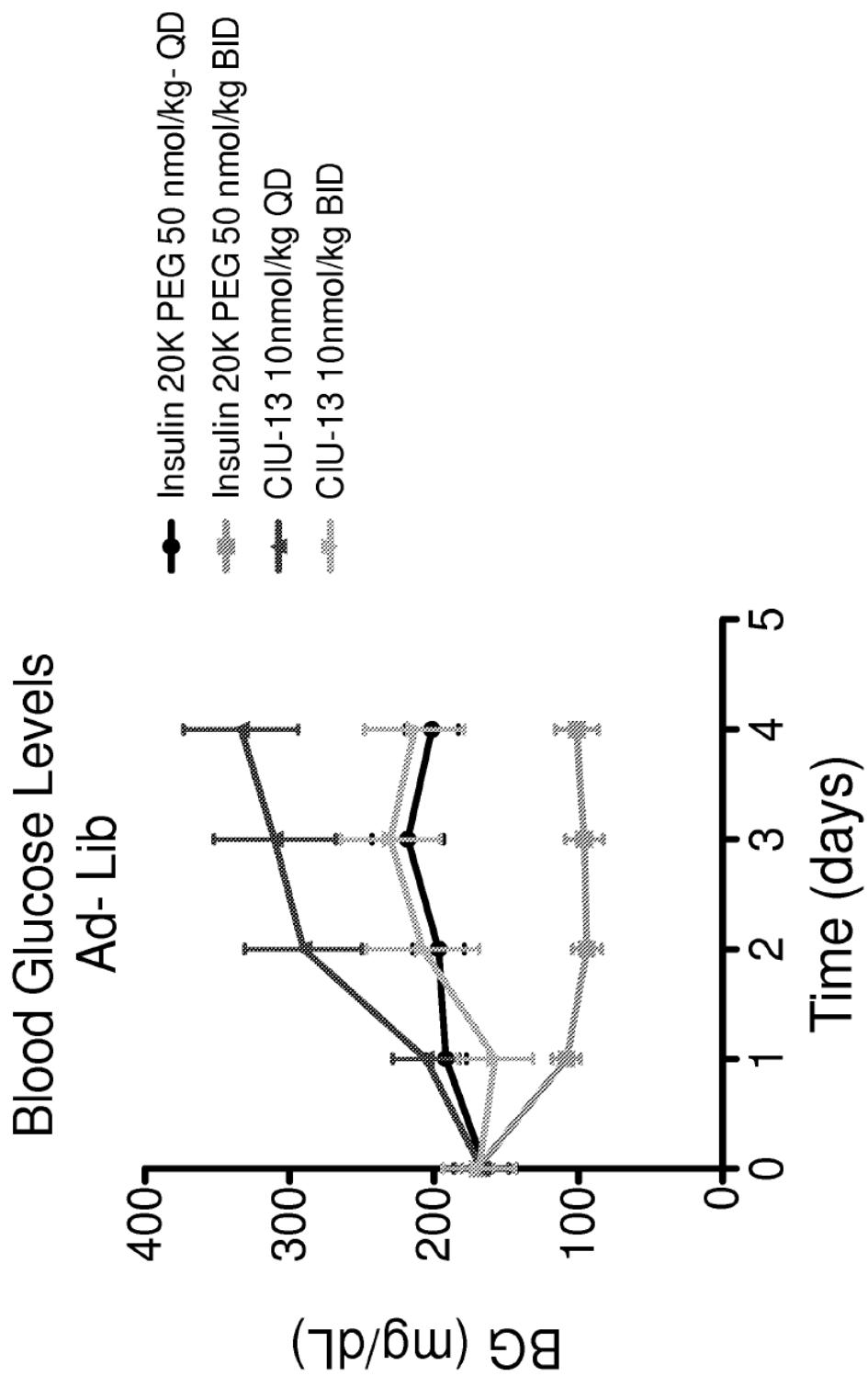
Fig. 14C Cumulative Food Intake



GLP-based Incretin

Fig. 14D

qd vs bid



GLP-based Lipidated Incretins

Fig. 15A

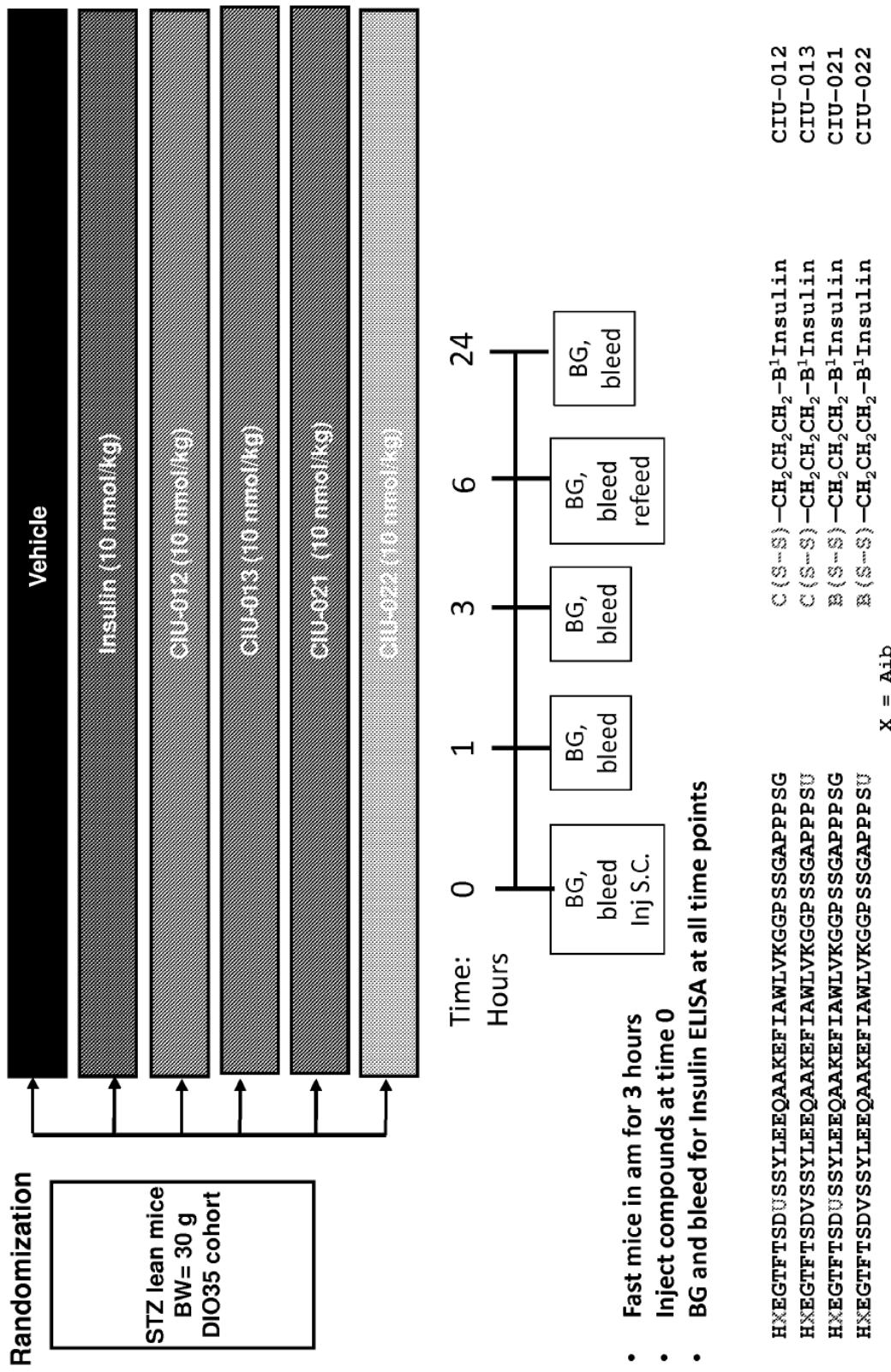


Fig. 15B **GLP-based Lipidated Incretins**

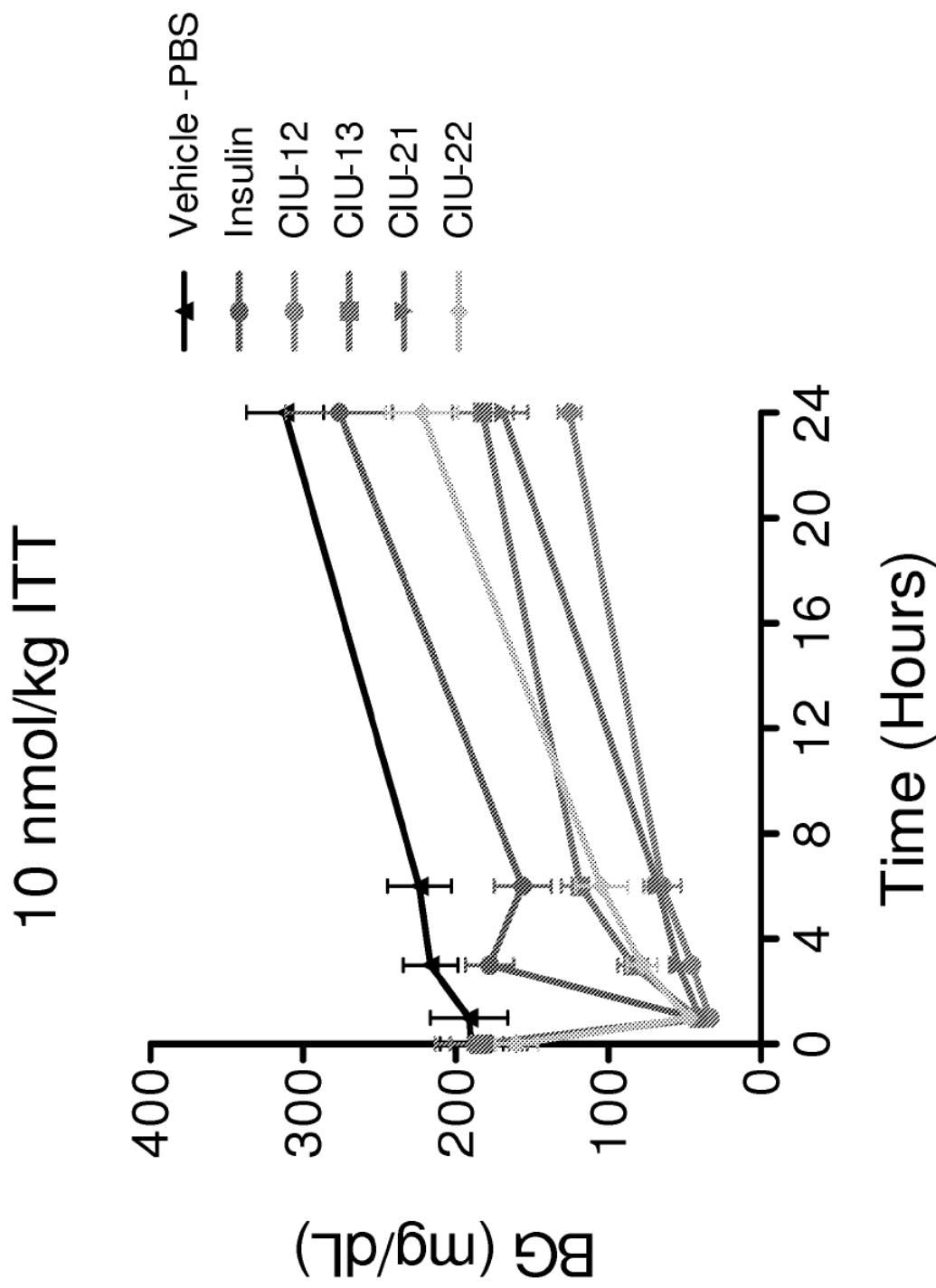


Fig. 15C GLP-based Lipidated Incretins

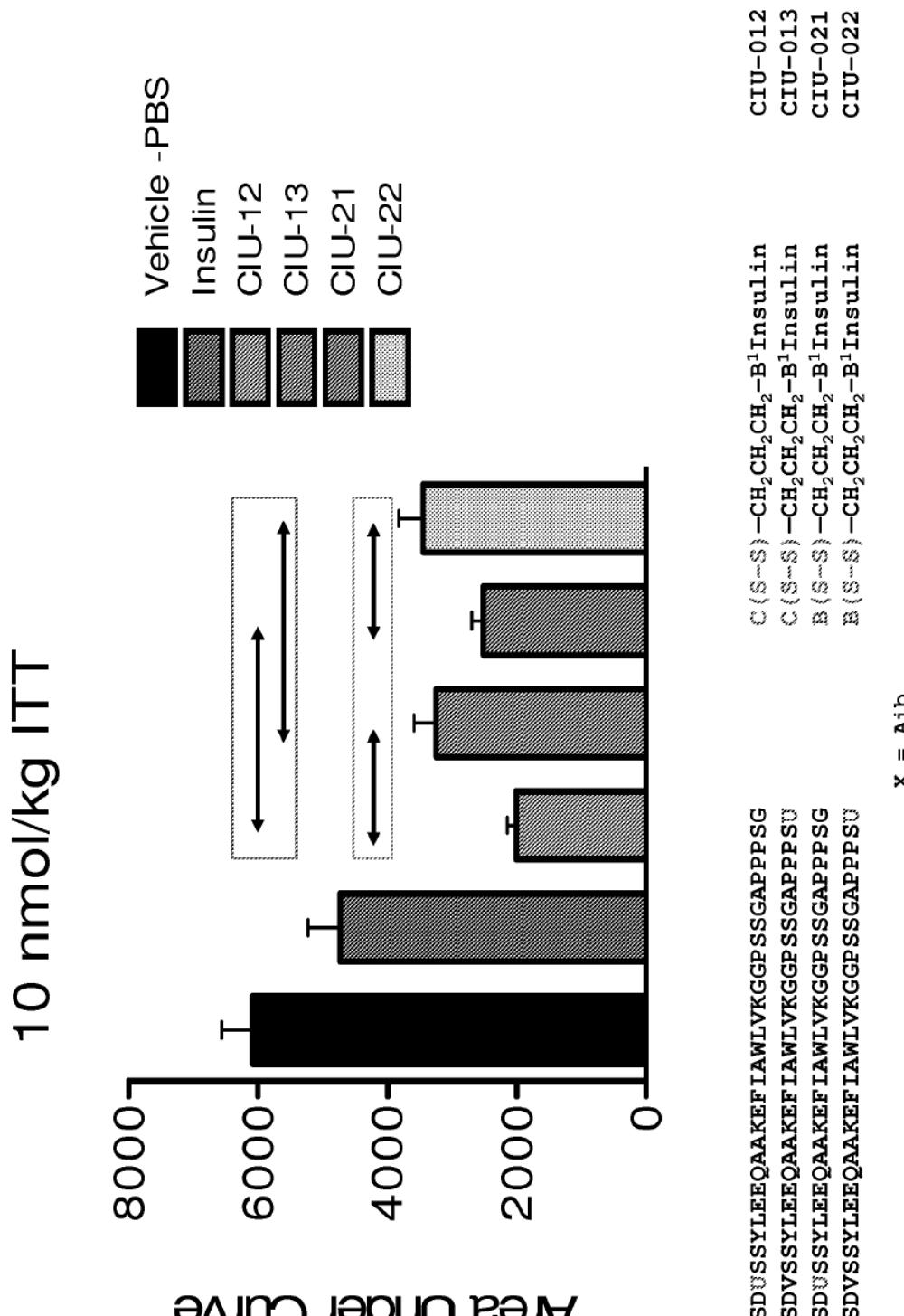


Fig. 16A GLP-based Pegylated Incretins

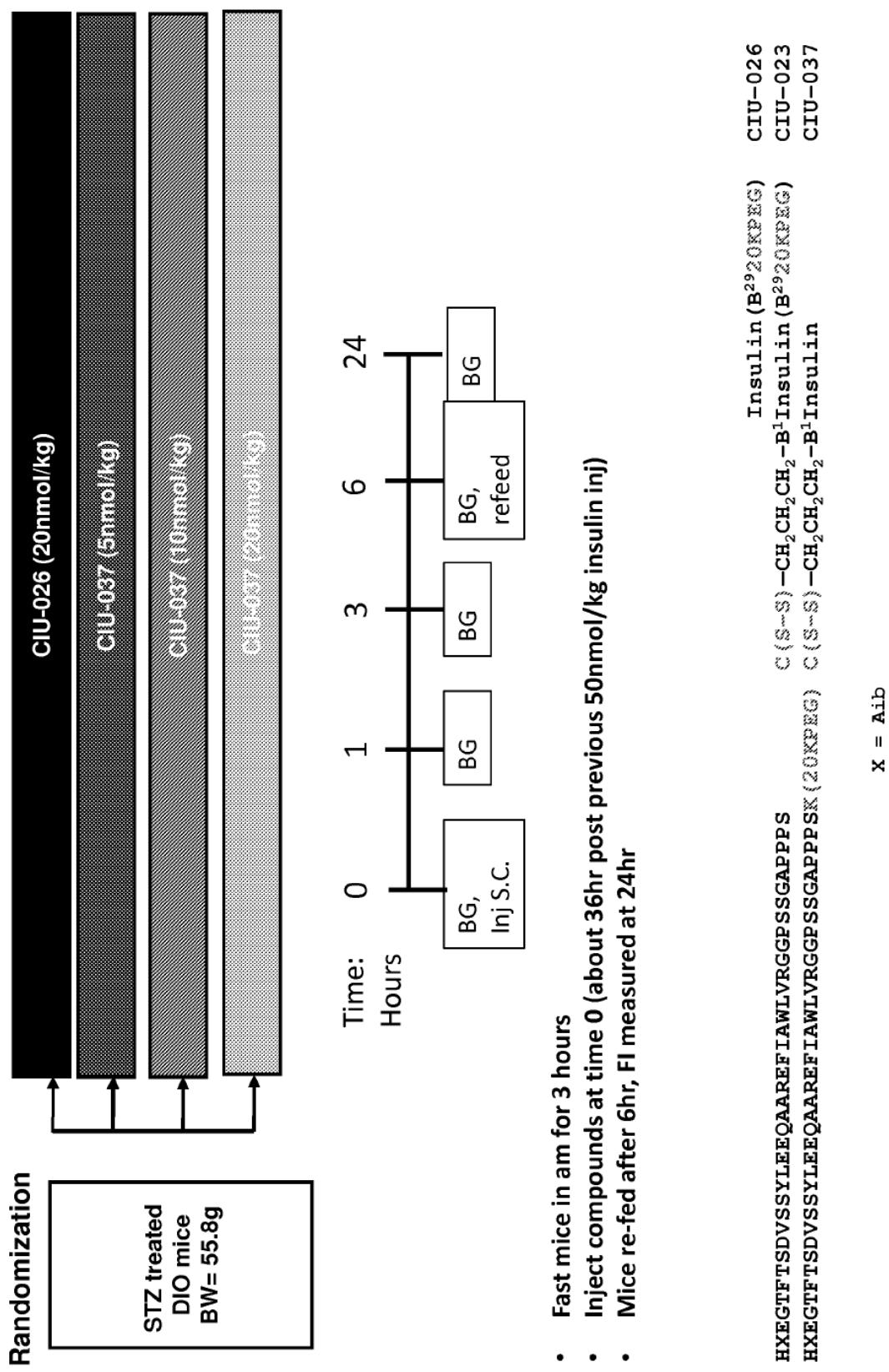
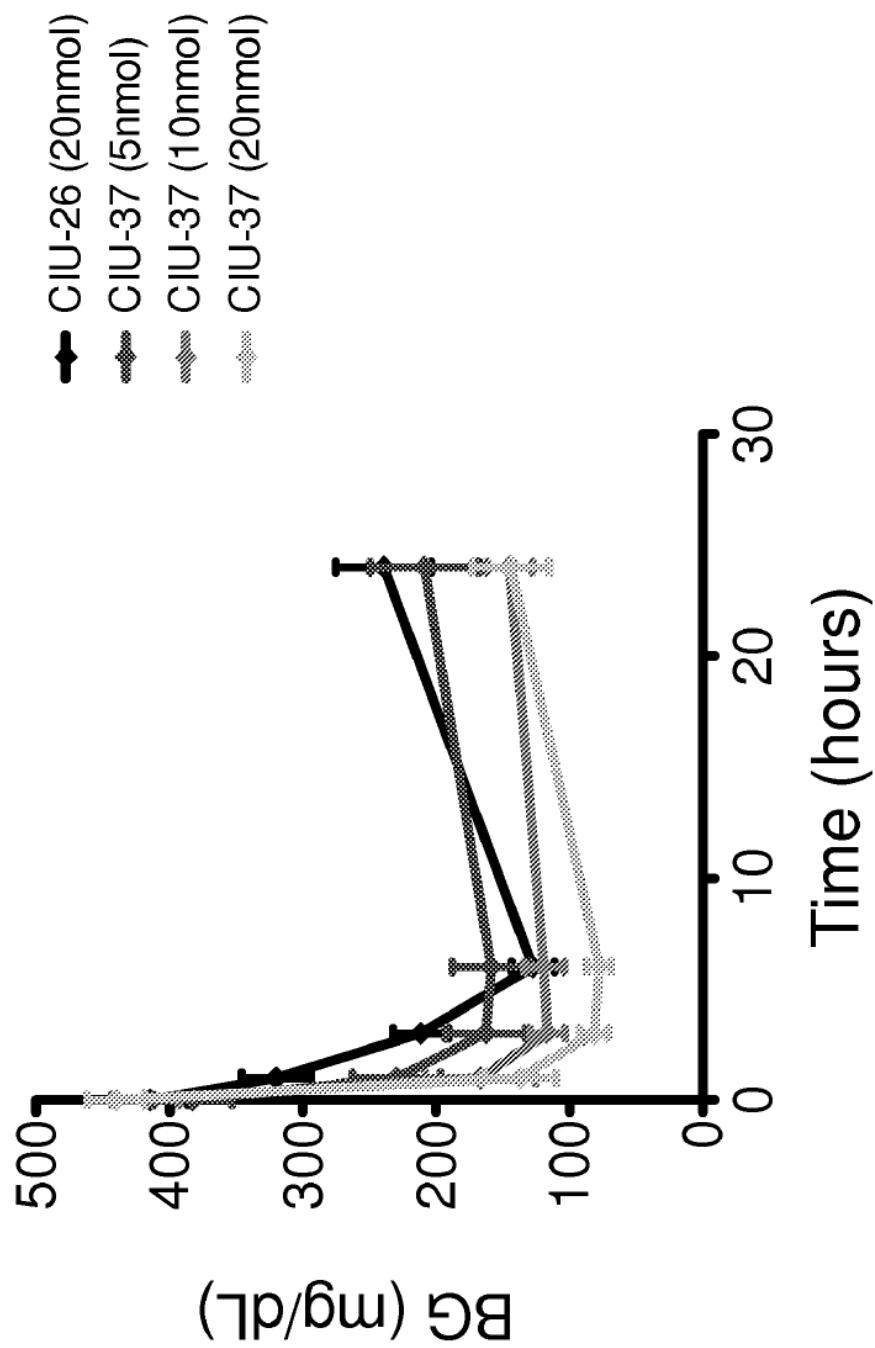


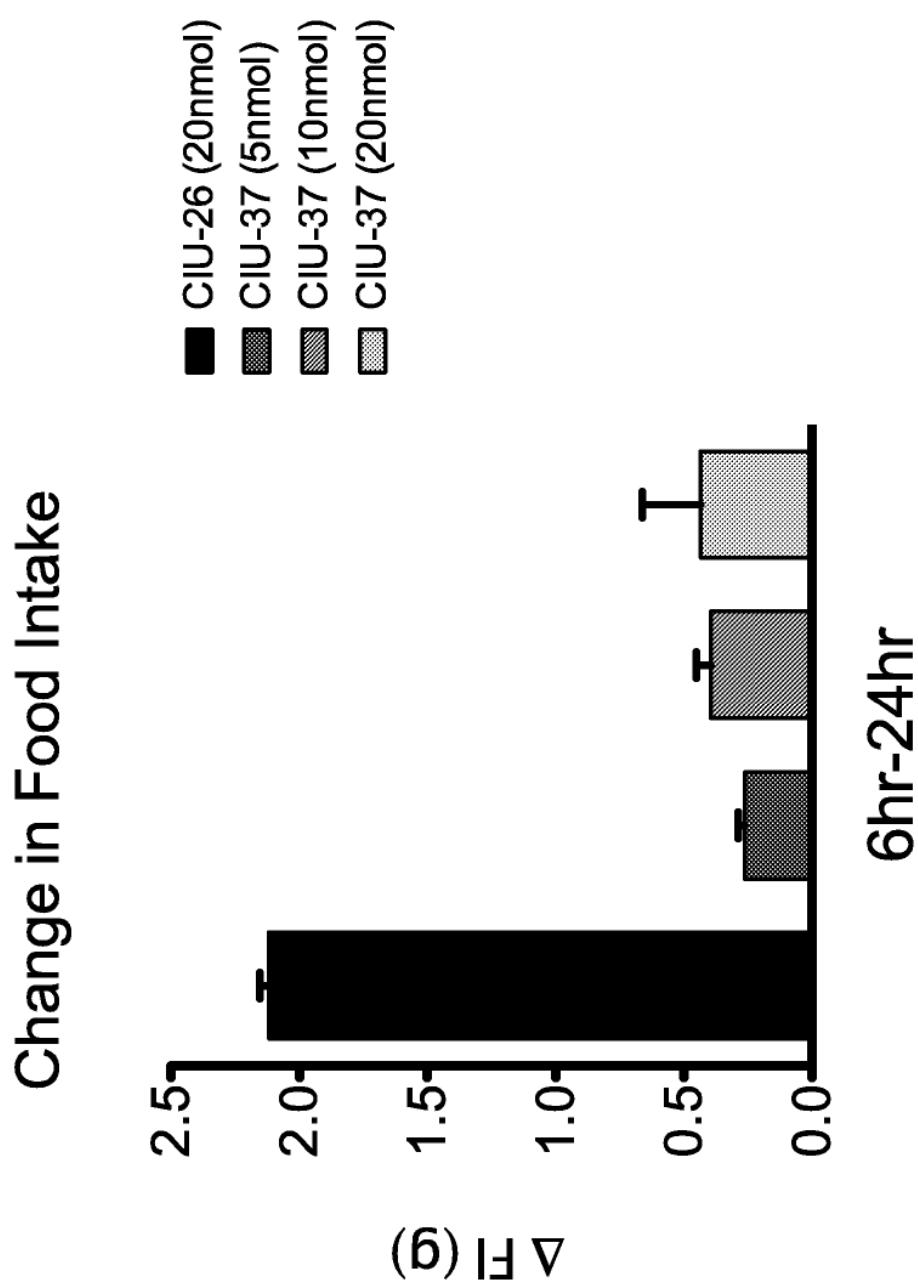
Fig. 16B

Dose Titration of CIU-037



I-37

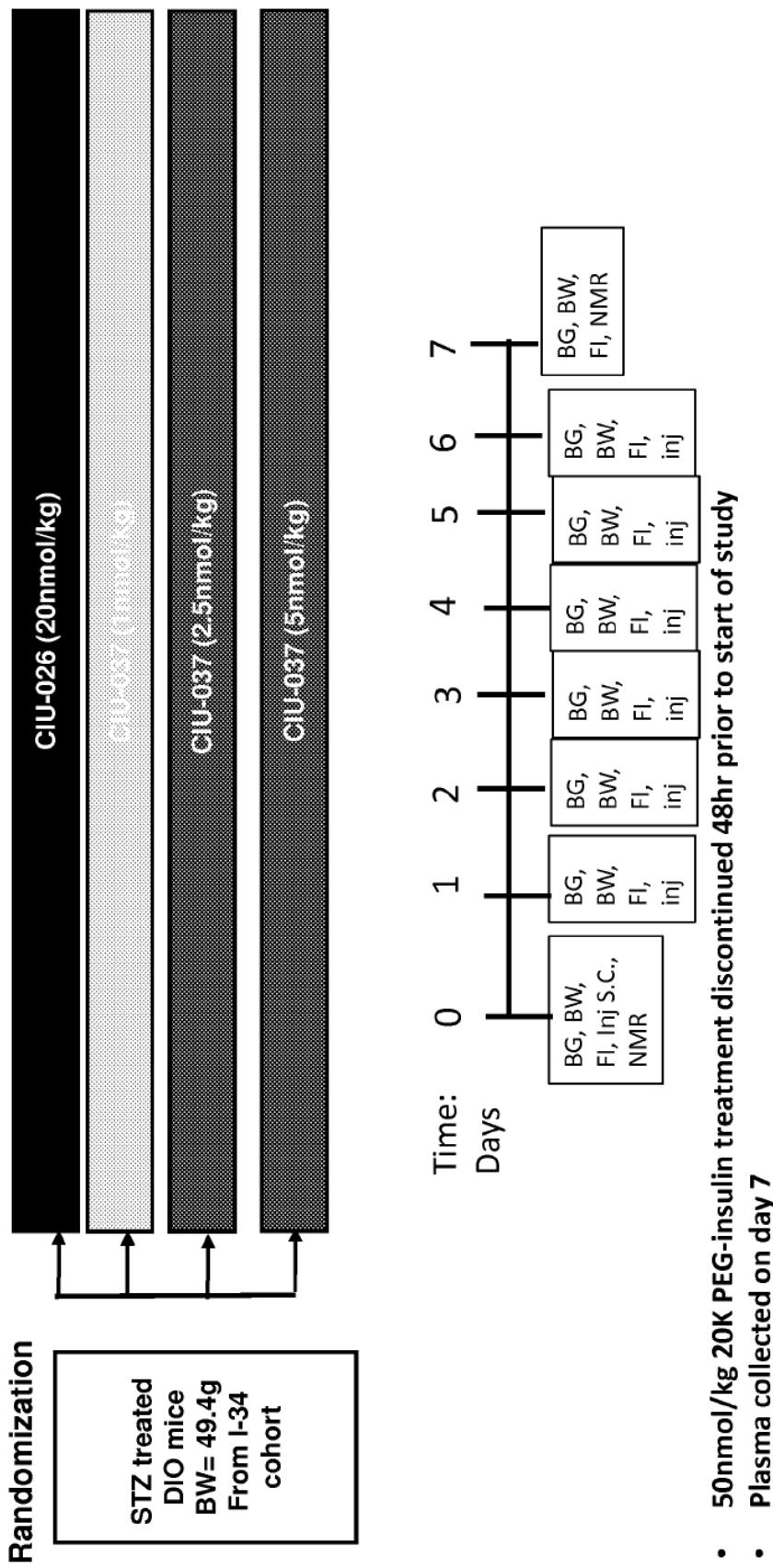
Fig. 16C



Exp. I-38

Pegylated Incretins

Fig. 17A



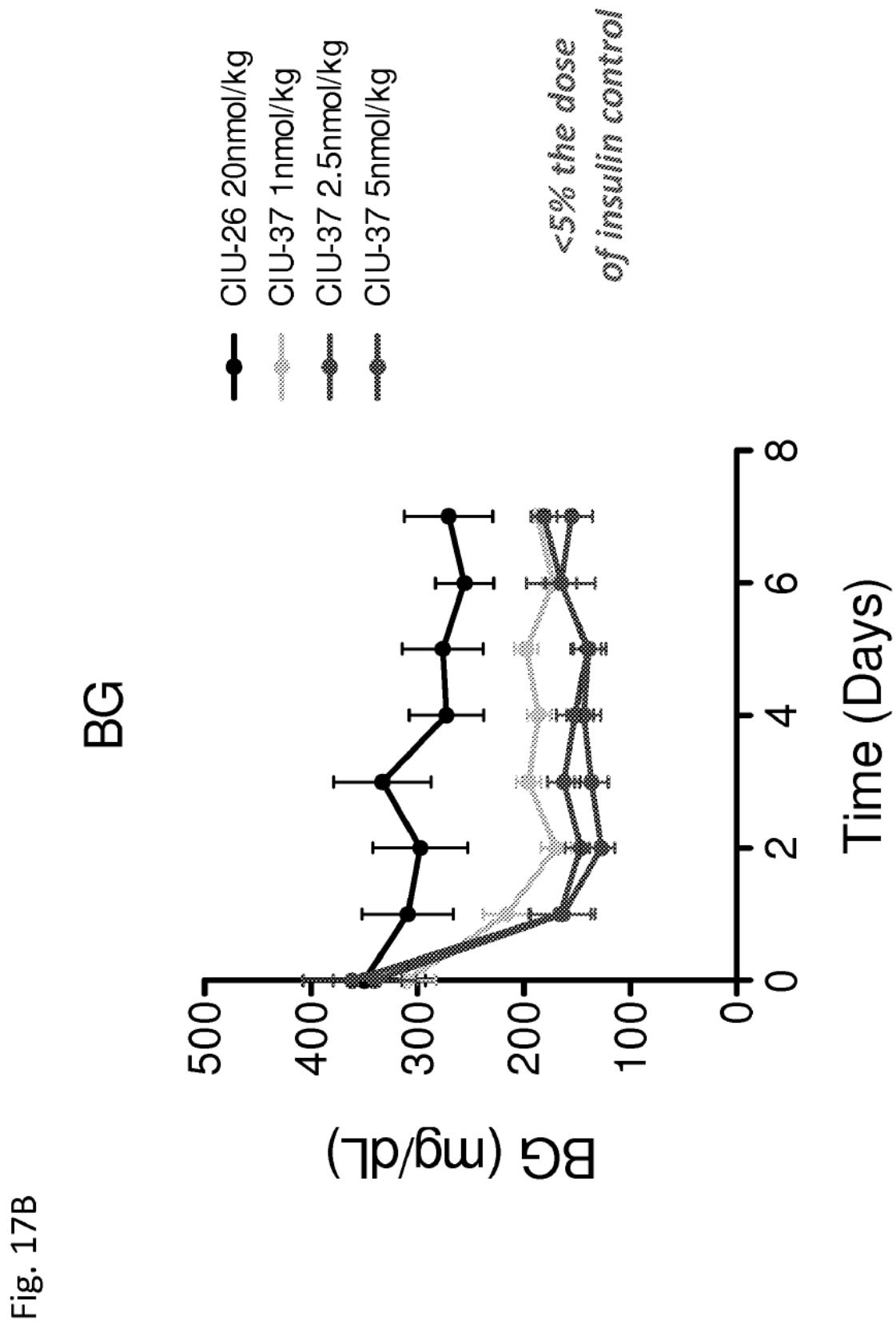


Fig. 17B

Fig. 17C

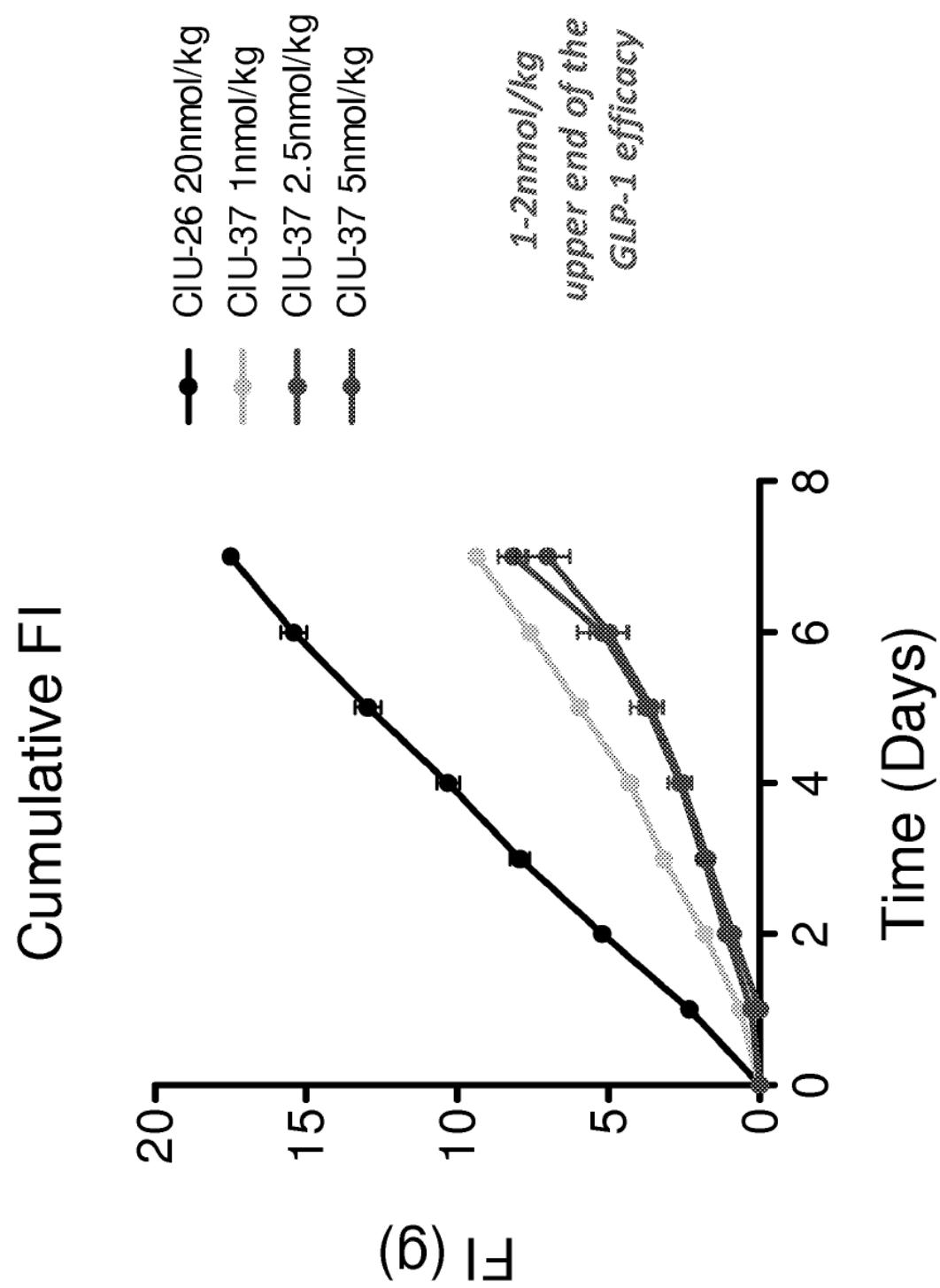
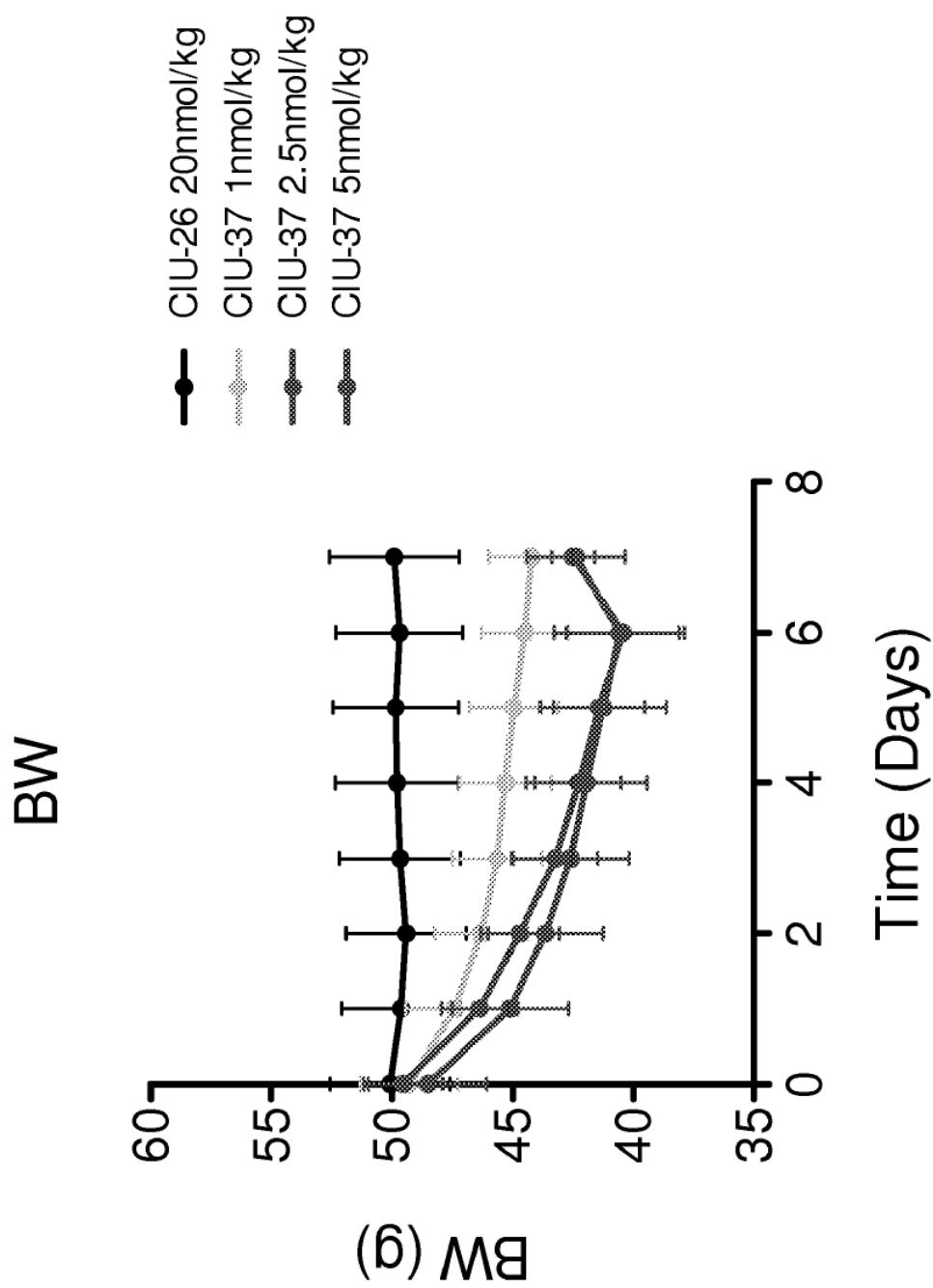


Fig. 17D A single molecule insulin agonist that controls BG in STZ-DIO mice
at 5% of an insulin dose through sizeable reduction in BW



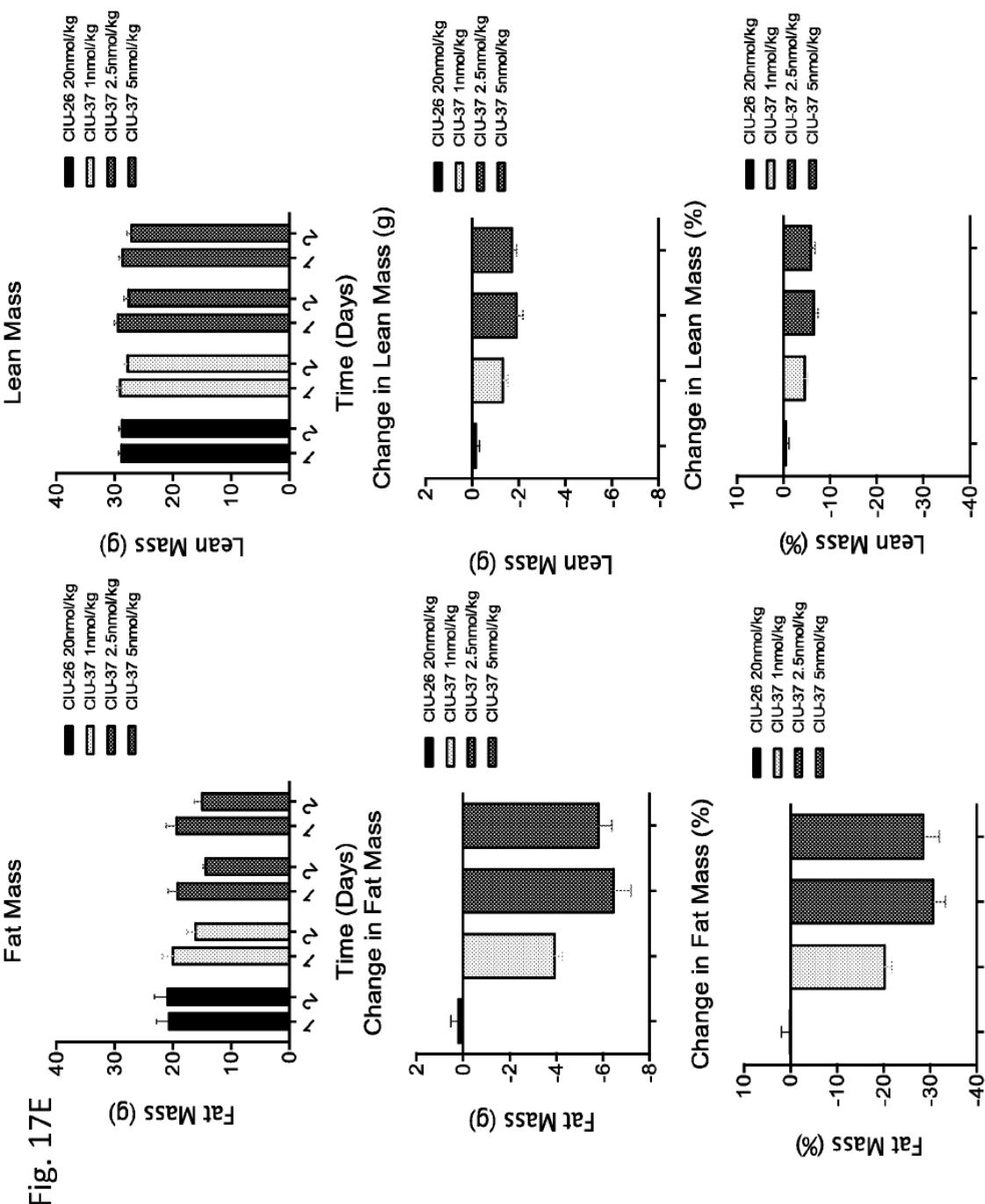
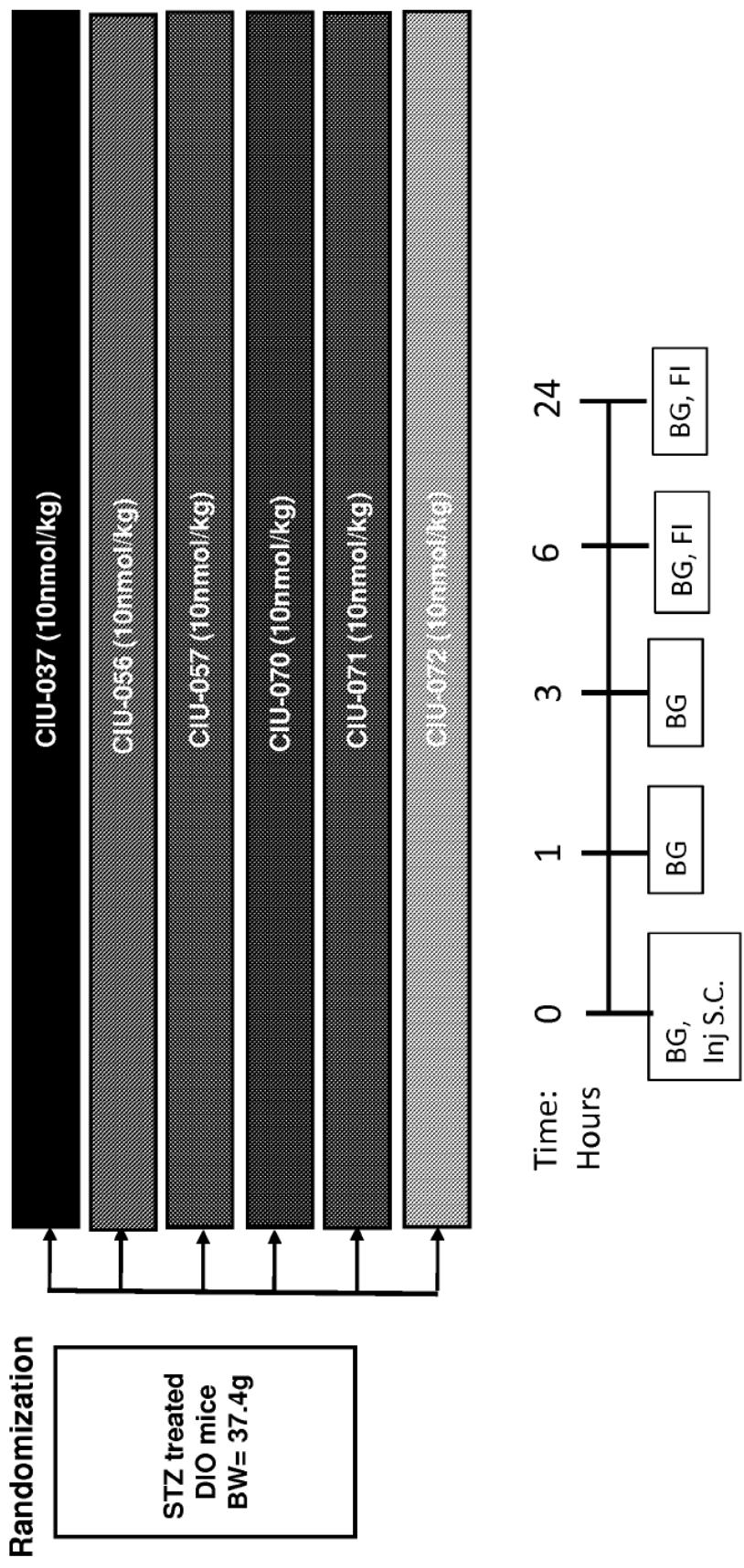


Fig. 18A Exp. I-48: Comparative Glucose Lowering (Incretin Dimers)



- Fast mice in am for 3 hours
- Inject compounds at time 0 (~11am, 36hr post previous 50nmol/kg 20K Peg insulin inj)
- Measure Blood Glucose Levels at 0, 1, 3, 6, and 24hrs, Food Intake measured at 6hr-24hr.
- DIO 36-mice from I-39 (STZ)

Fig. 18B

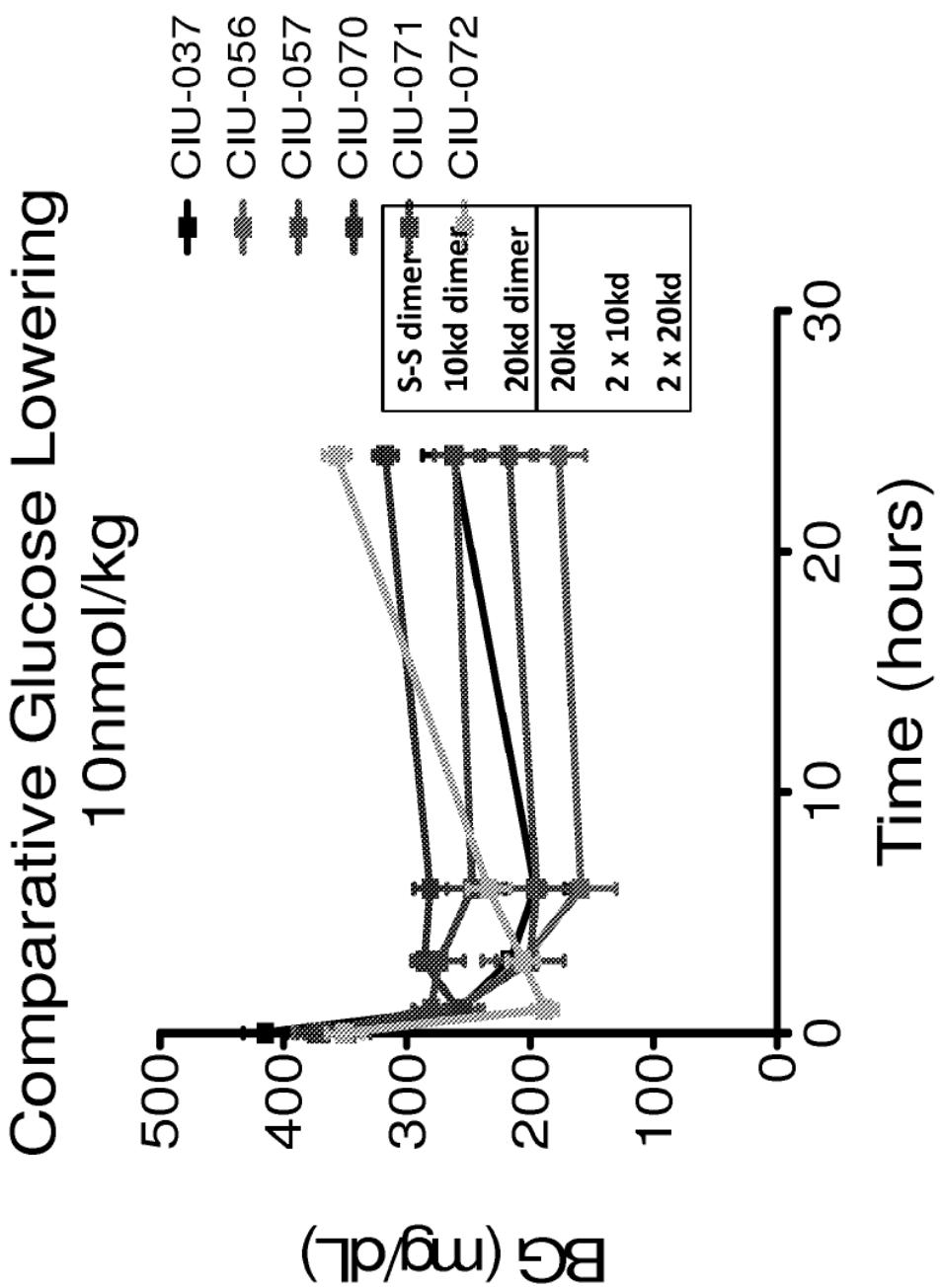


Fig. 18B cont.

MEGIFTISDVSSVAAFEQAAAEFIC(20kPEG)WIVRGCPSSGAPPSSK(20kPEG)	C(S-S)—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —B1Insulin	CIU-056
MEGIFTISDVSSVAAFEQAAAEFIC(10kPEG)WIVRGCPSSGAPPSSK(10kPEG)	C(S-S)—CH ₂ CH ₂ CH ₂ —B1 ¹ Insulin	CIU-057
MEGIFTISDVSSVAAFEQAAAEFIC(20kPEG)WIVRGCPSSGAPPSSK(20kPEG)	C(S-S)—B1Insulin	CIU-058
MEGIFTISDVSSVAAFEQAAAEFIC(10kPEG)WIVRGCPSSGAPPSSK(10kPEG)	C(S-S)—B1 ¹ Insulin	CIU-071
MEGIFTISDVSSVAAFEQAAAEFIC(20kPEG)WIVRGCPSSGAPPSSK(20kPEG)	C(S-S)—B1Insulin	CIU-072

$$x = \text{Aib}$$

Fig. 18C

Change in Blood Glucose

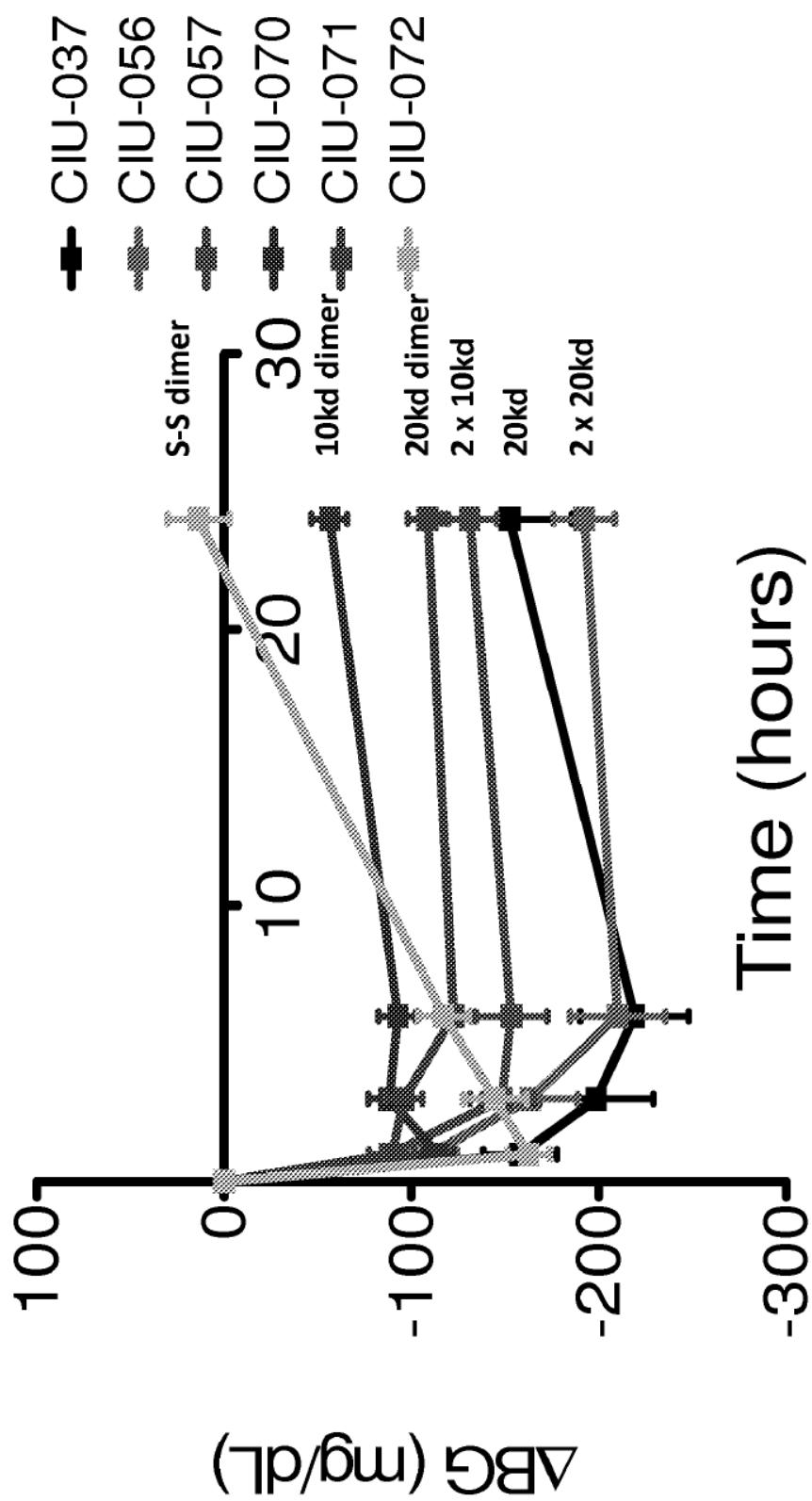


Fig. 19A

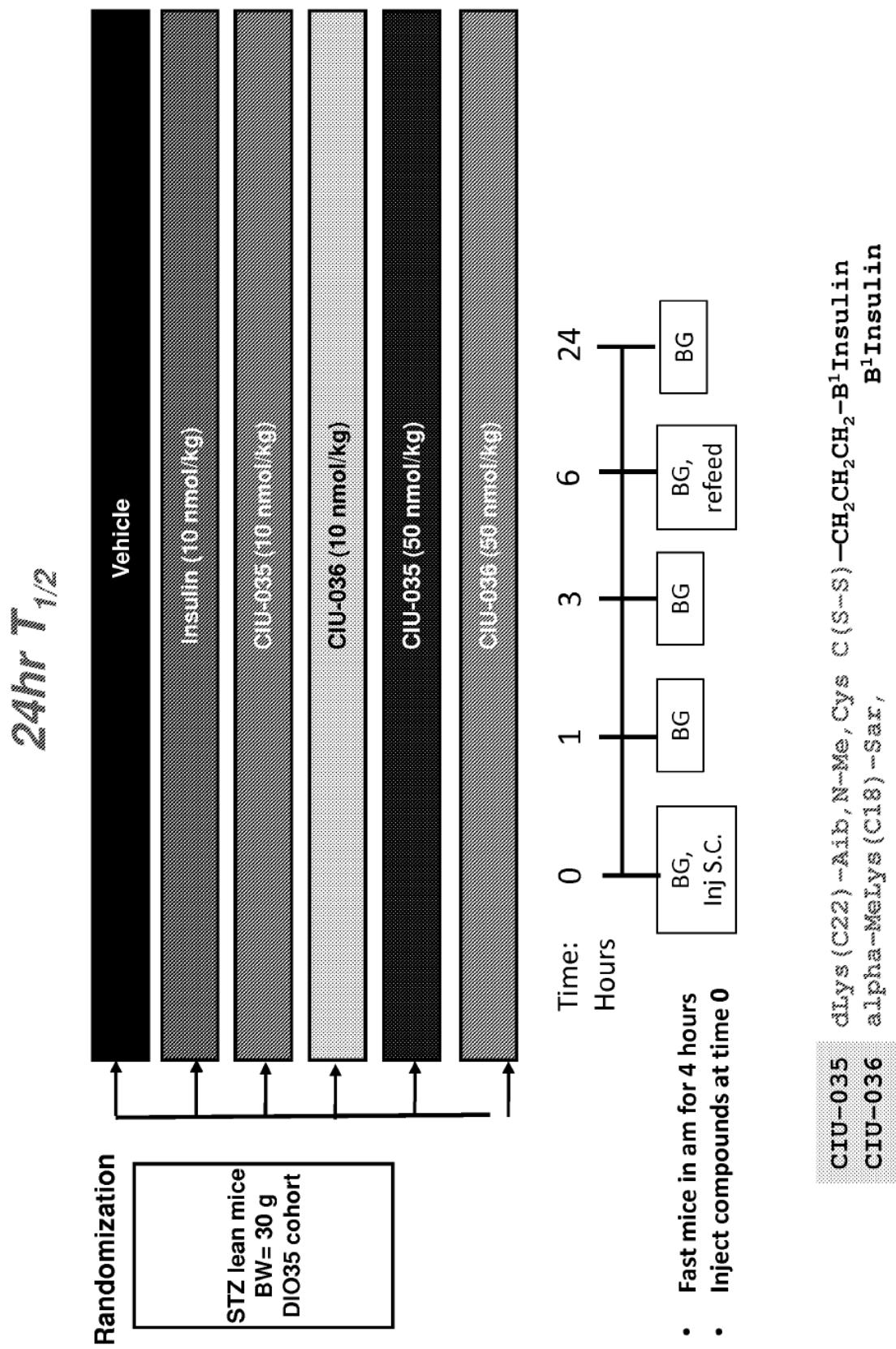
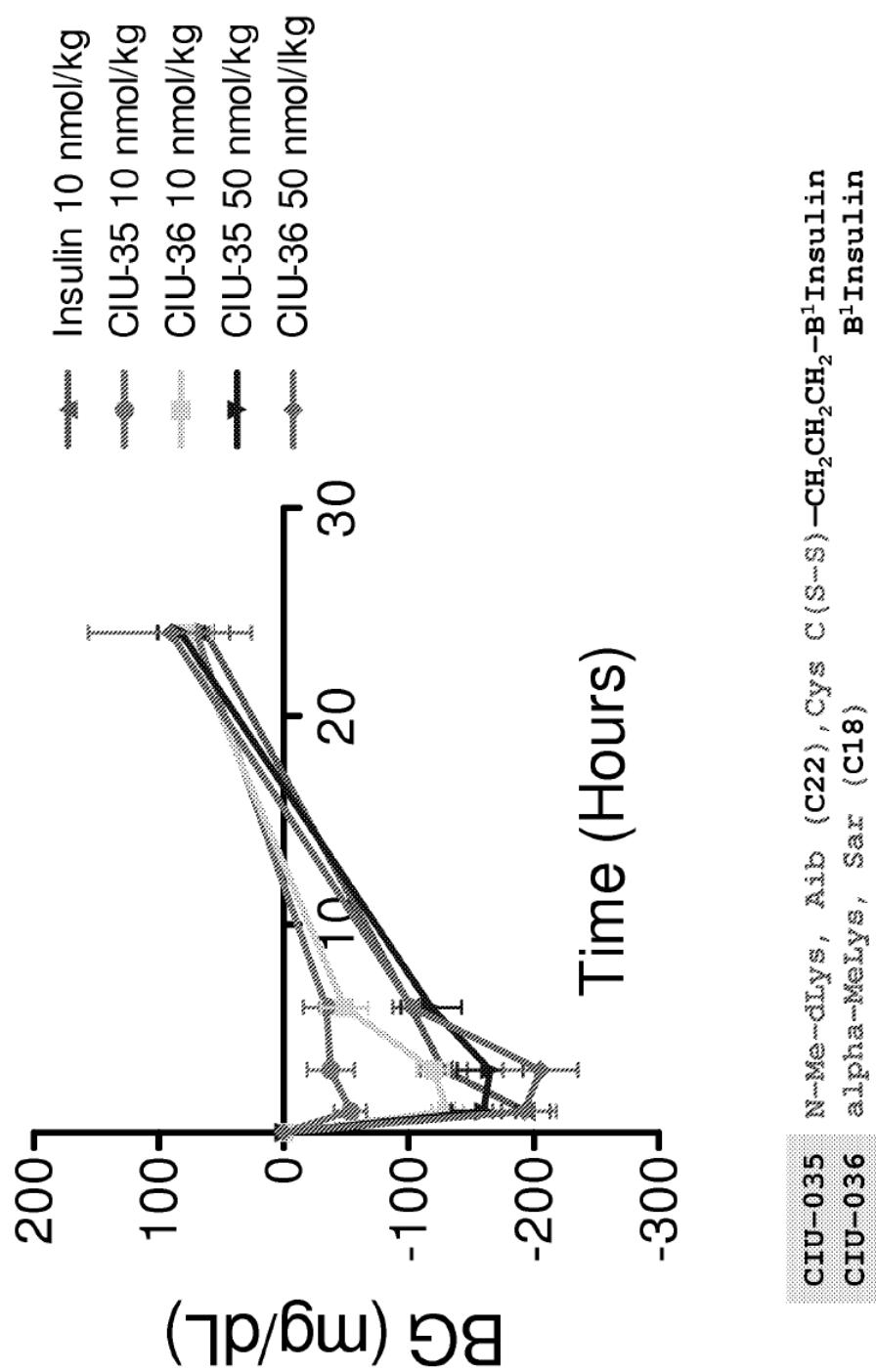
Lipidated Insulin Prodrugs

Fig. 19B

Lipidated Insulin Prodrugs

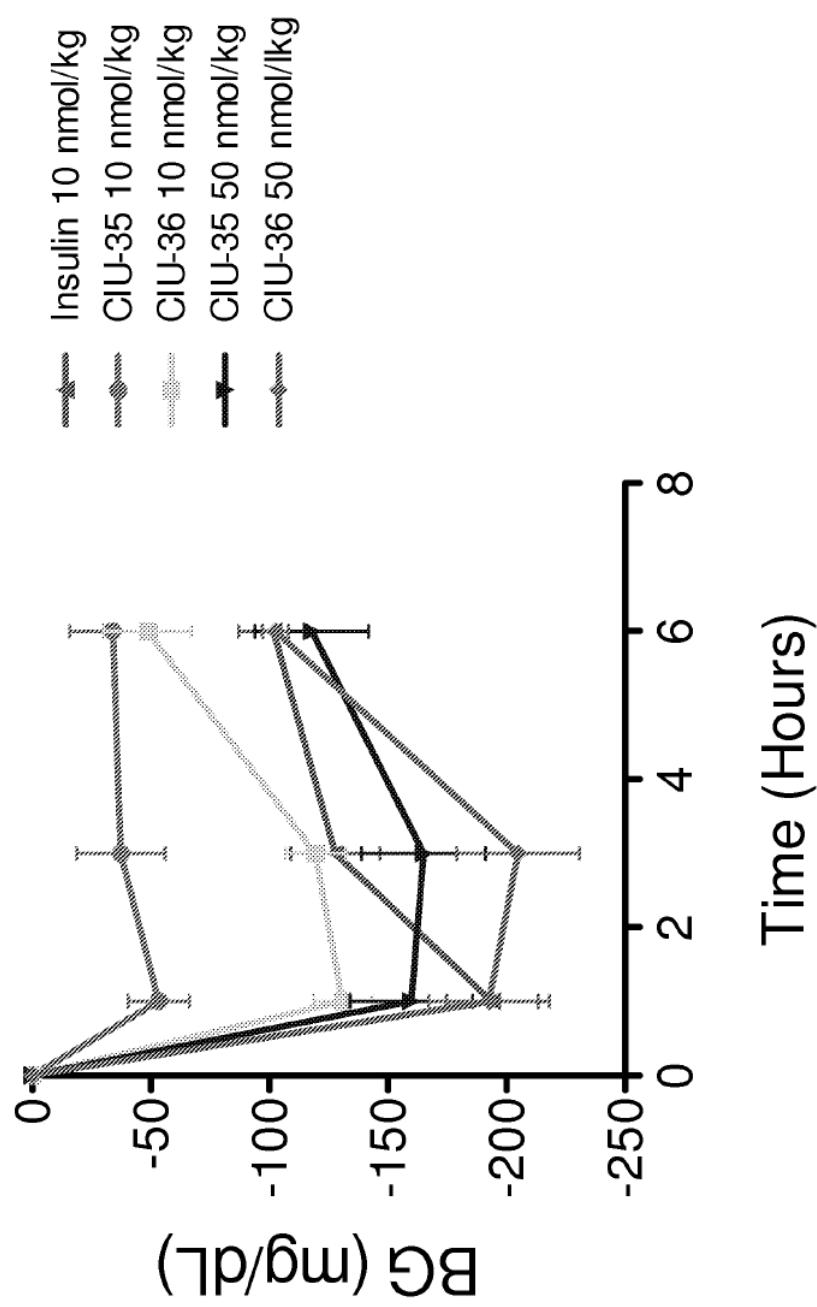
Baseline-corrected of ITT



Lipidated Insulin Prodrugs

Fig. 19C

First 6 only Baseline-corrected of ITT



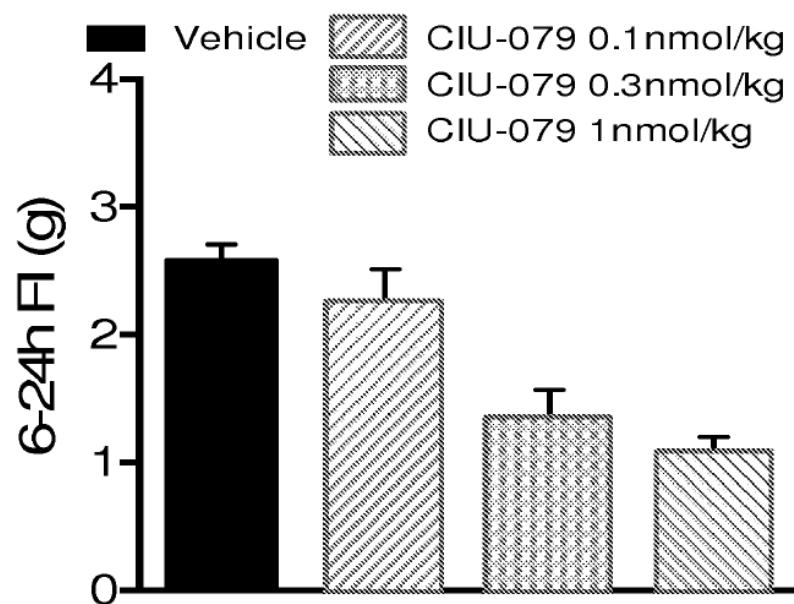


Fig. 20

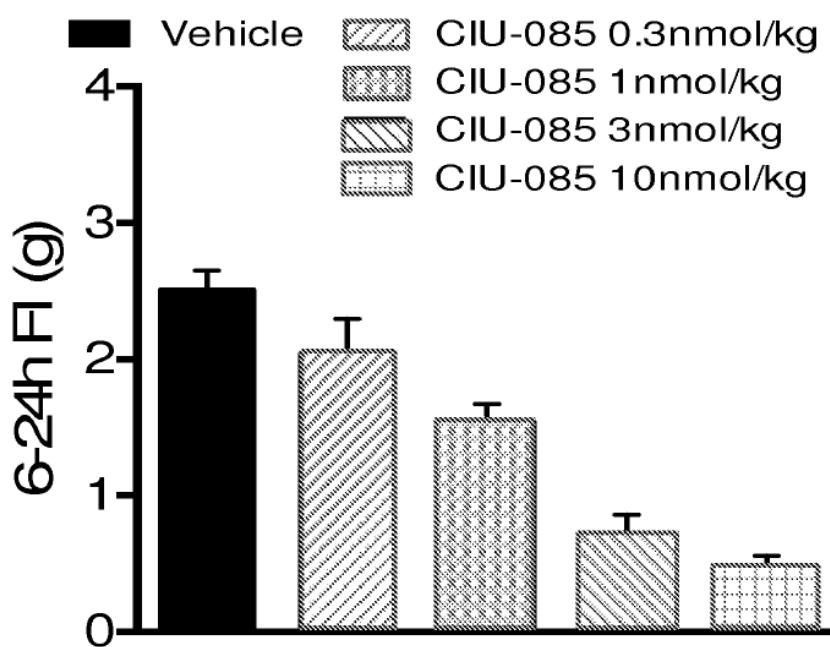


Fig 21

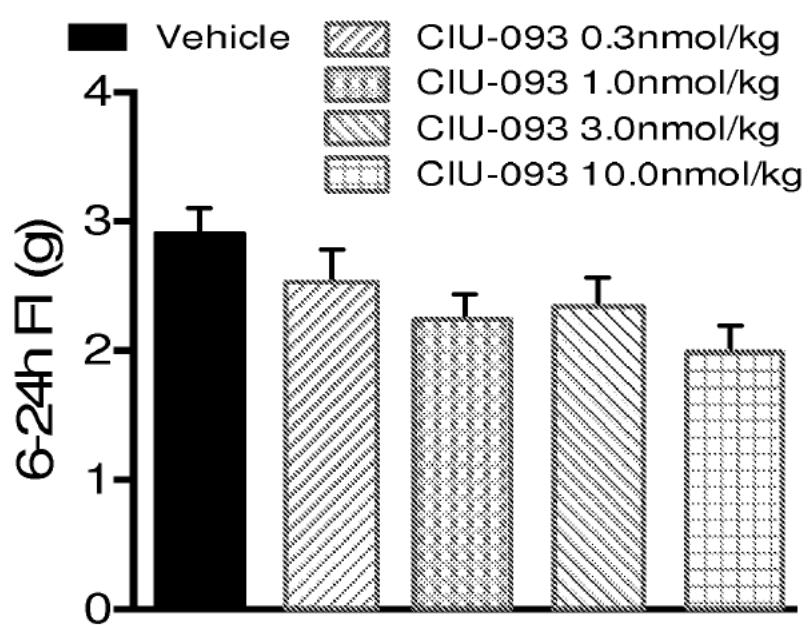
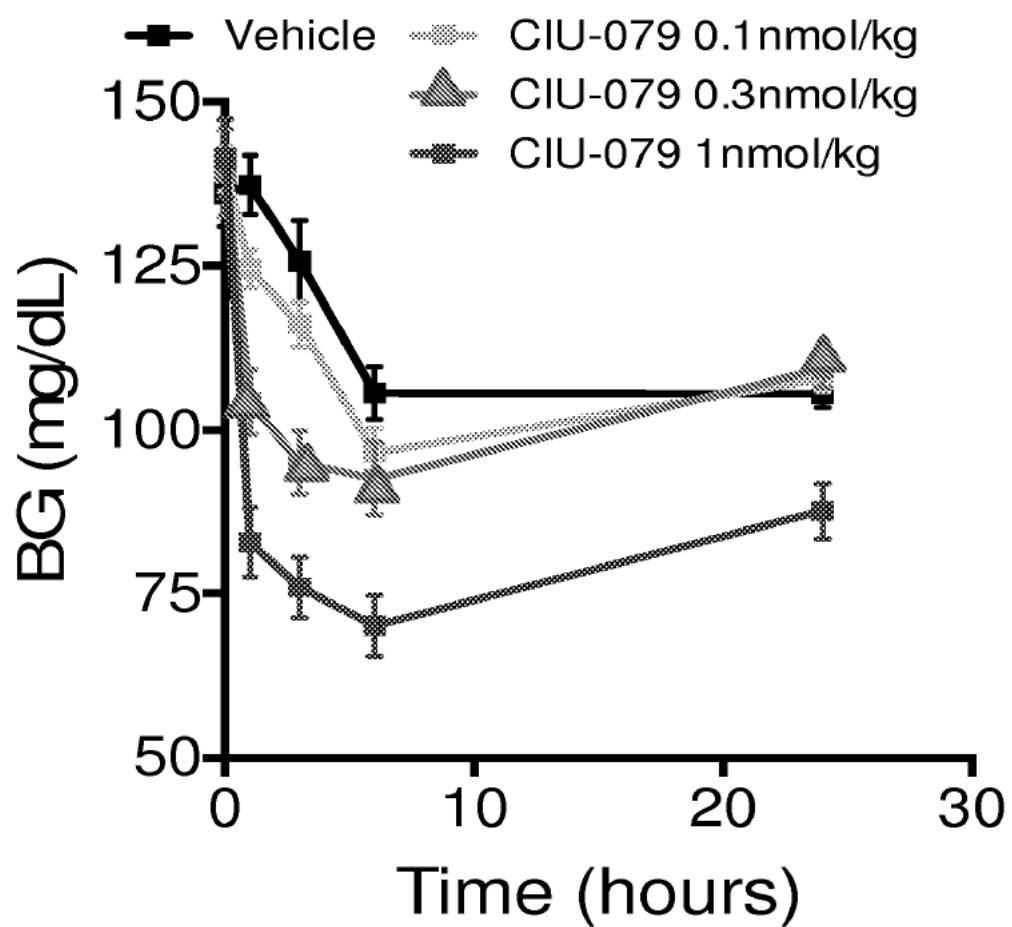


Fig. 22

**Fig. 23**

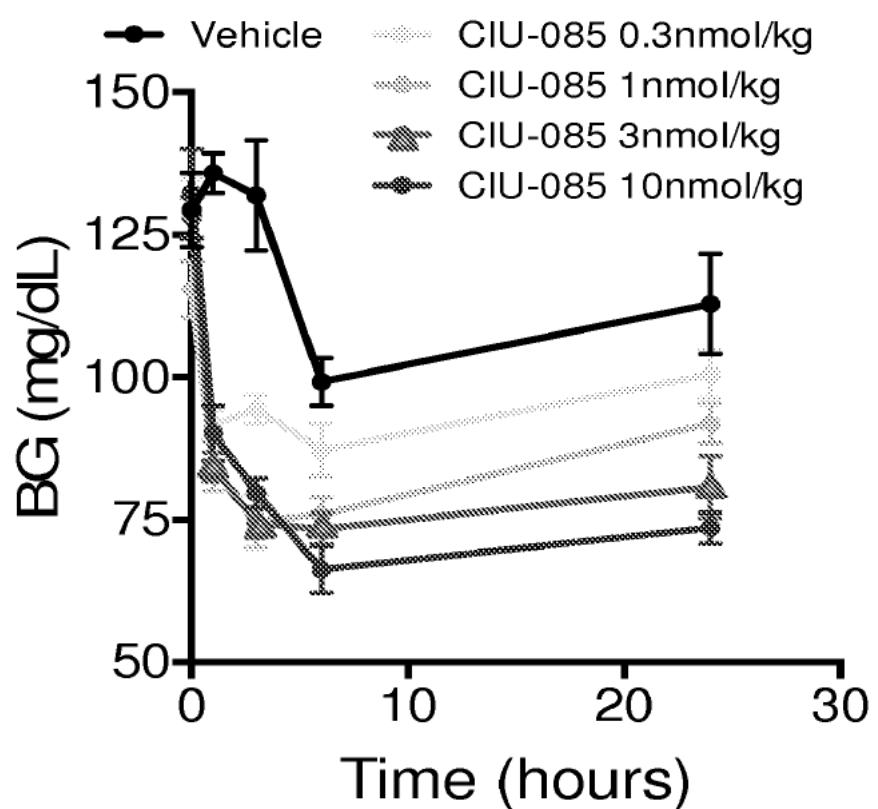
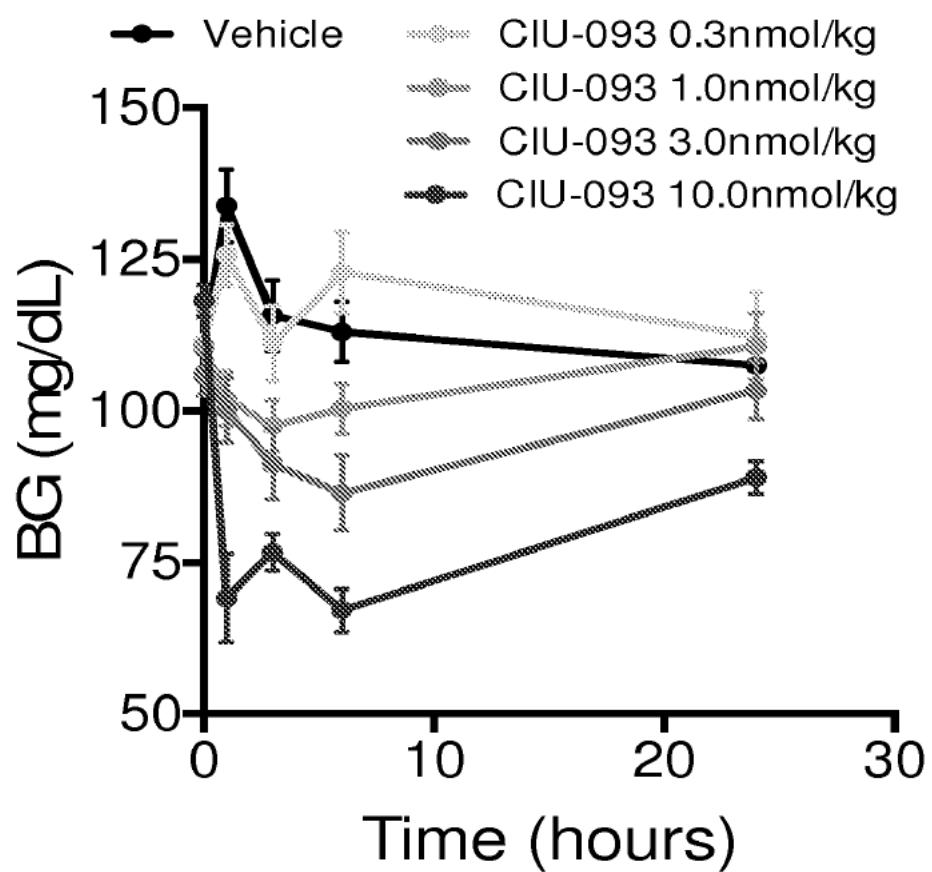
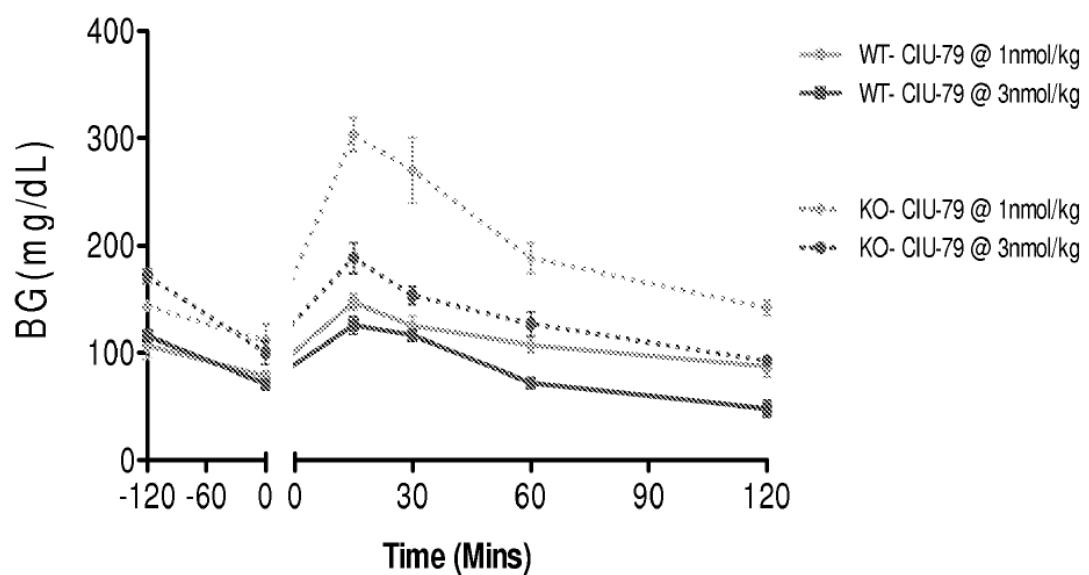
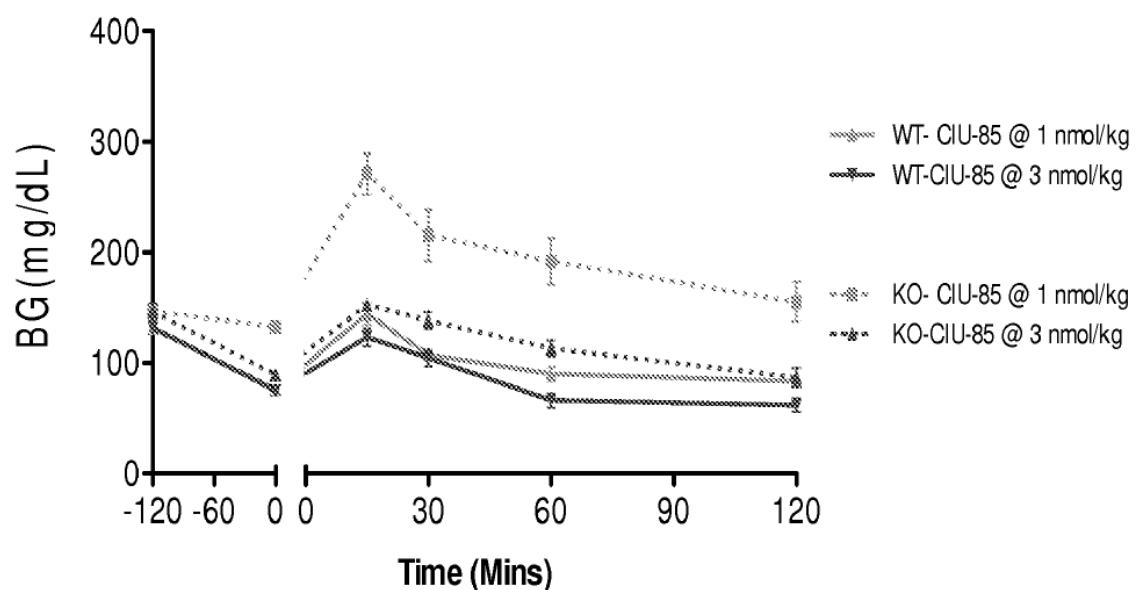


Fig. 24

**Fig. 25**

**Fig. 26****Fig. 27**

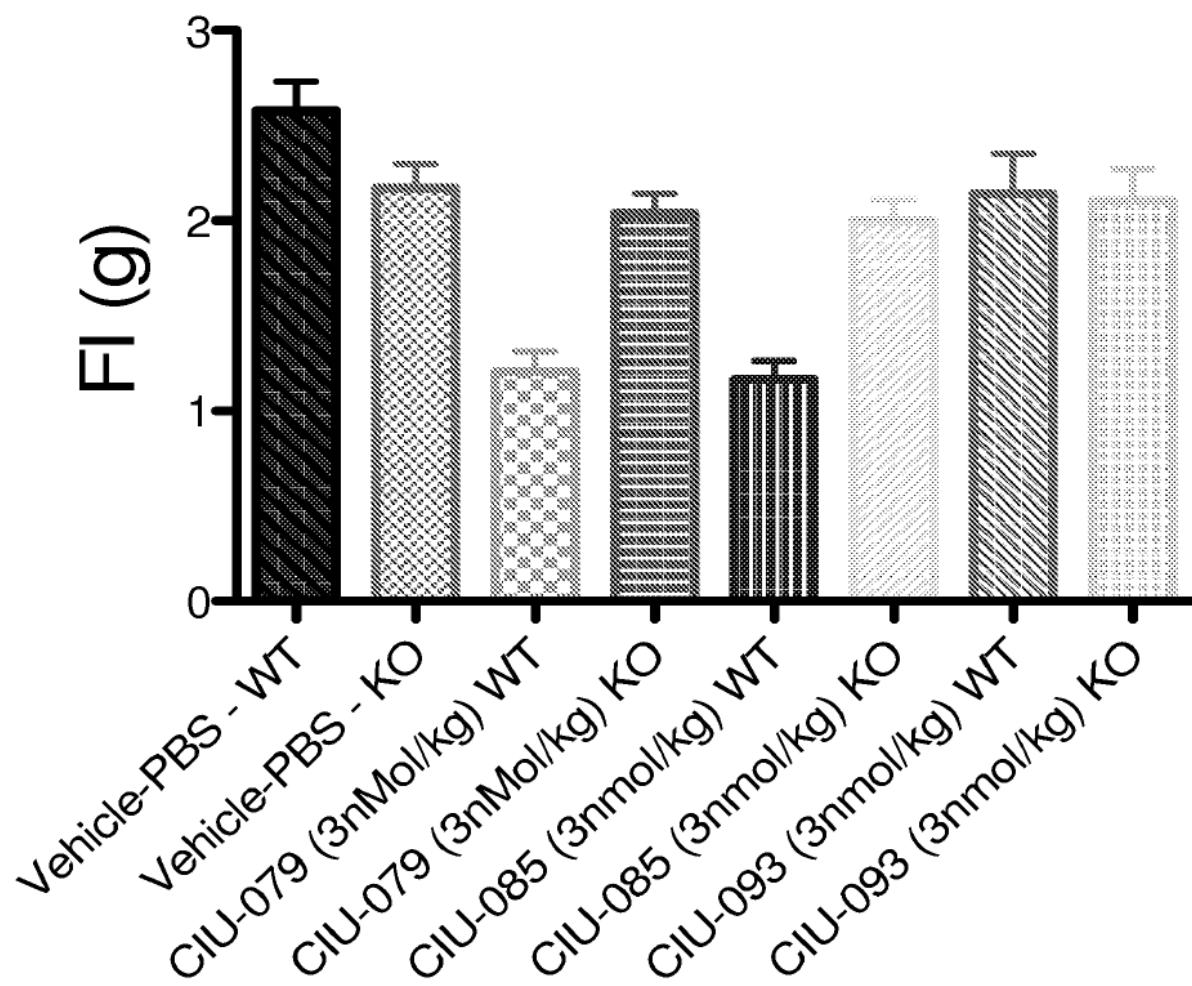
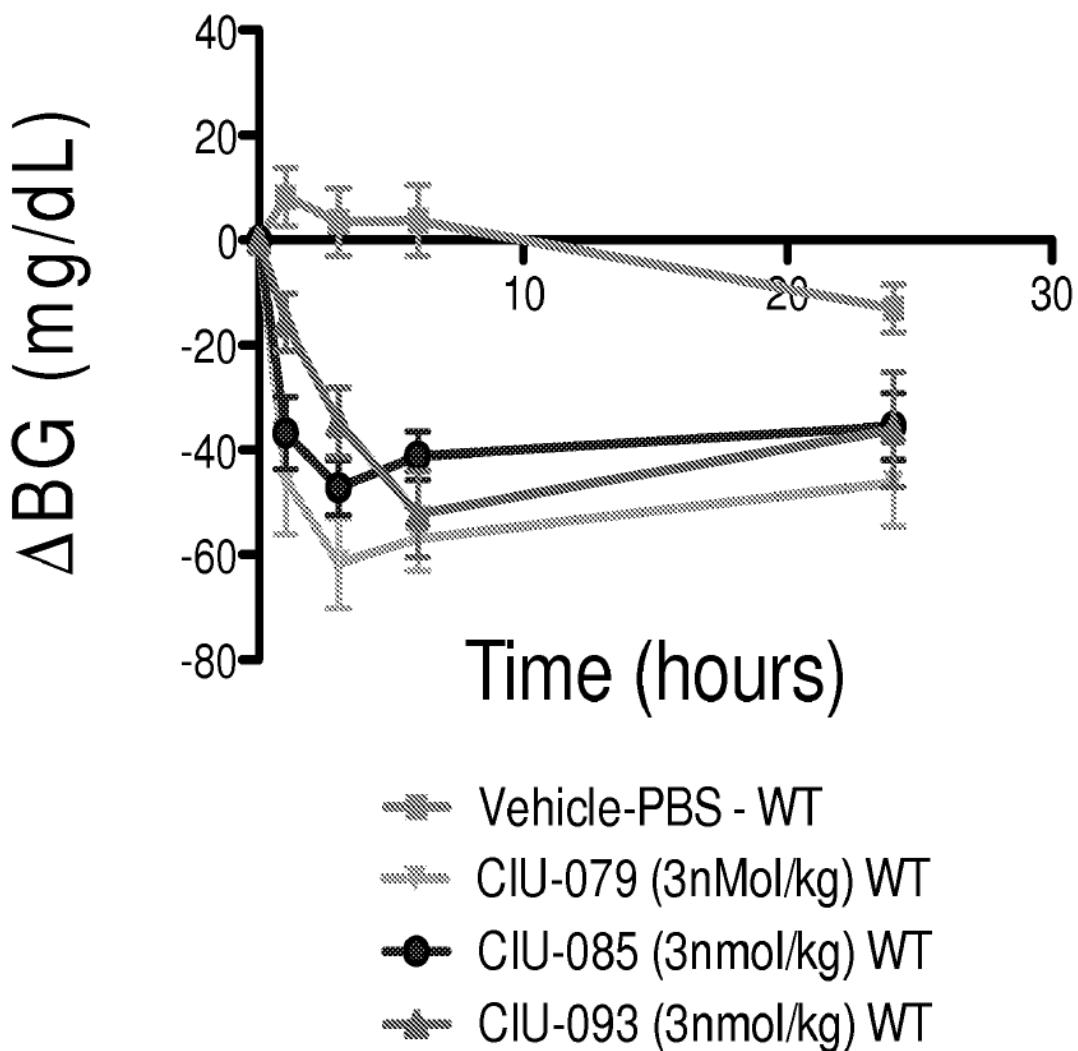
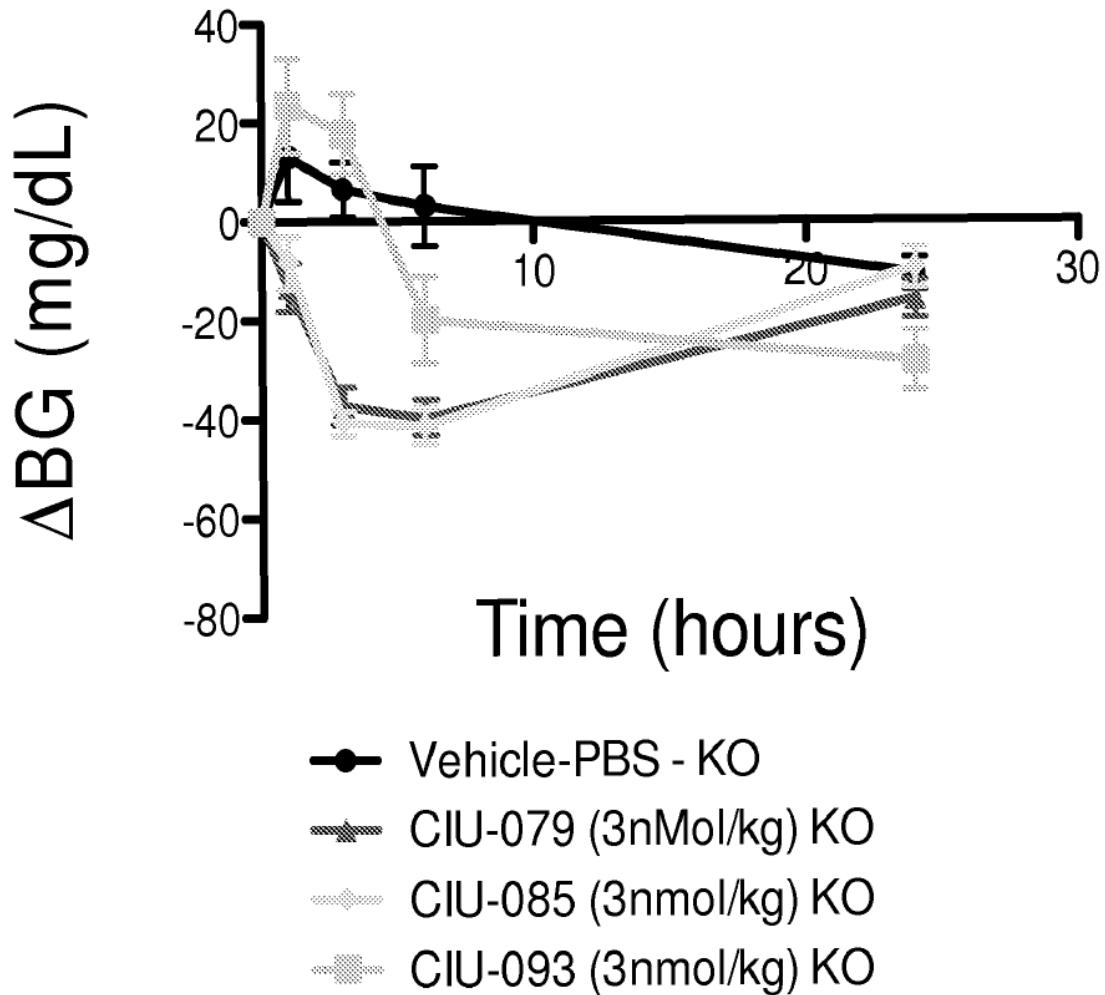


Fig. 28

**Fig. 29**

**Fig. 30**

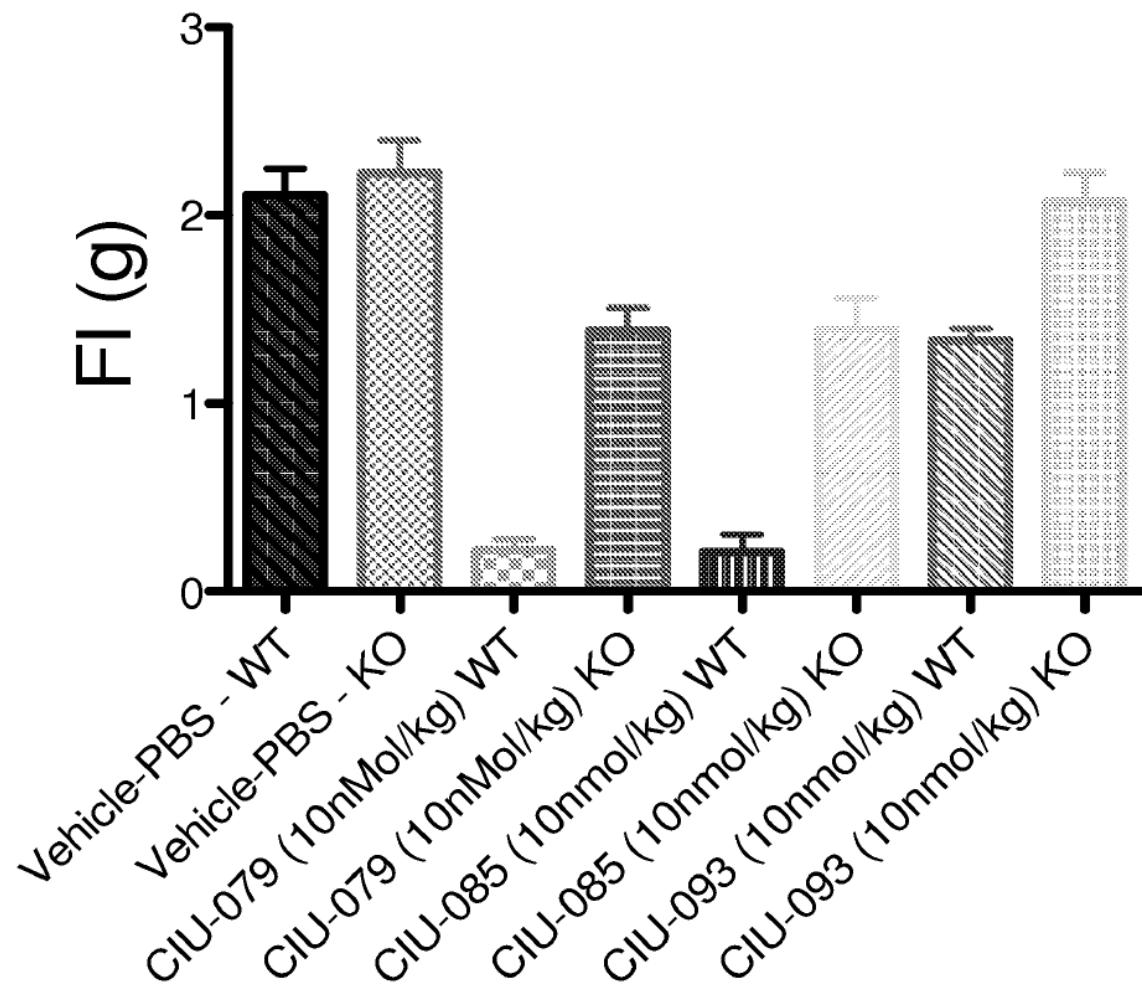


Fig. 31

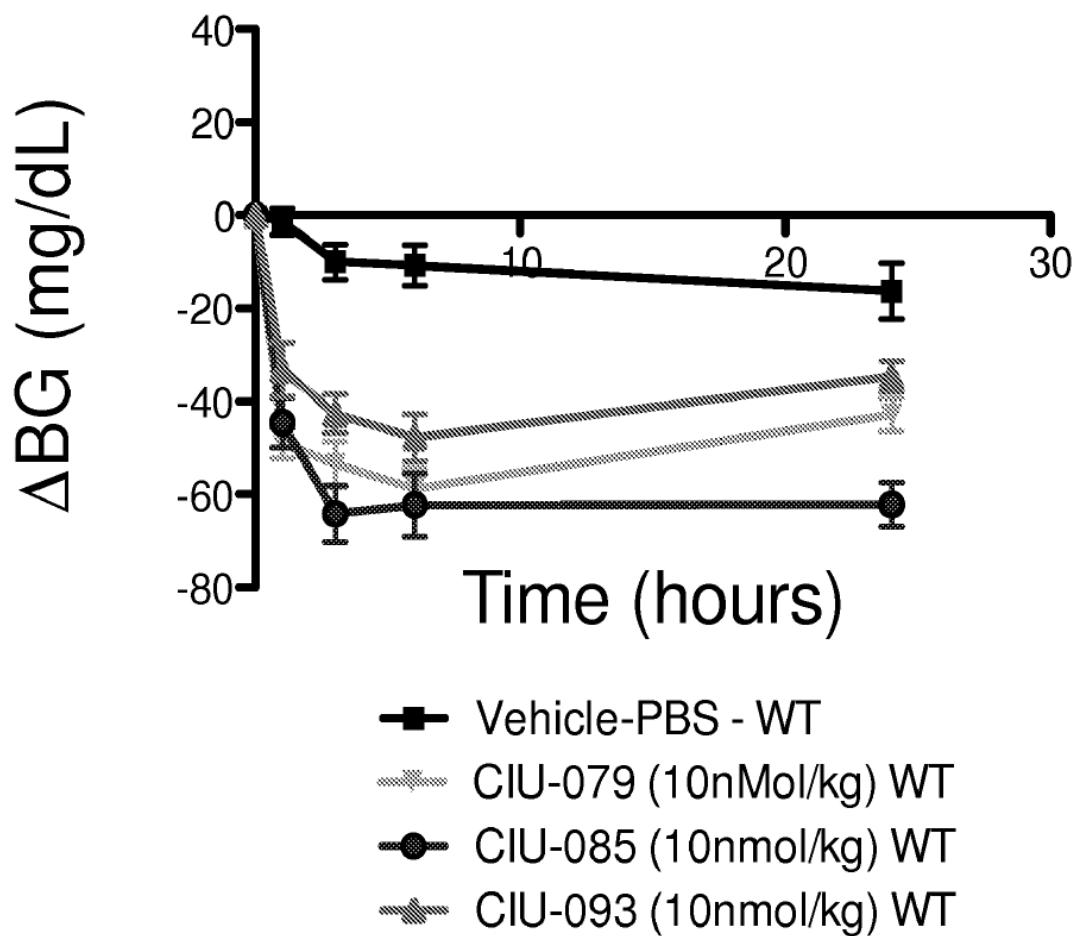


Fig. 32

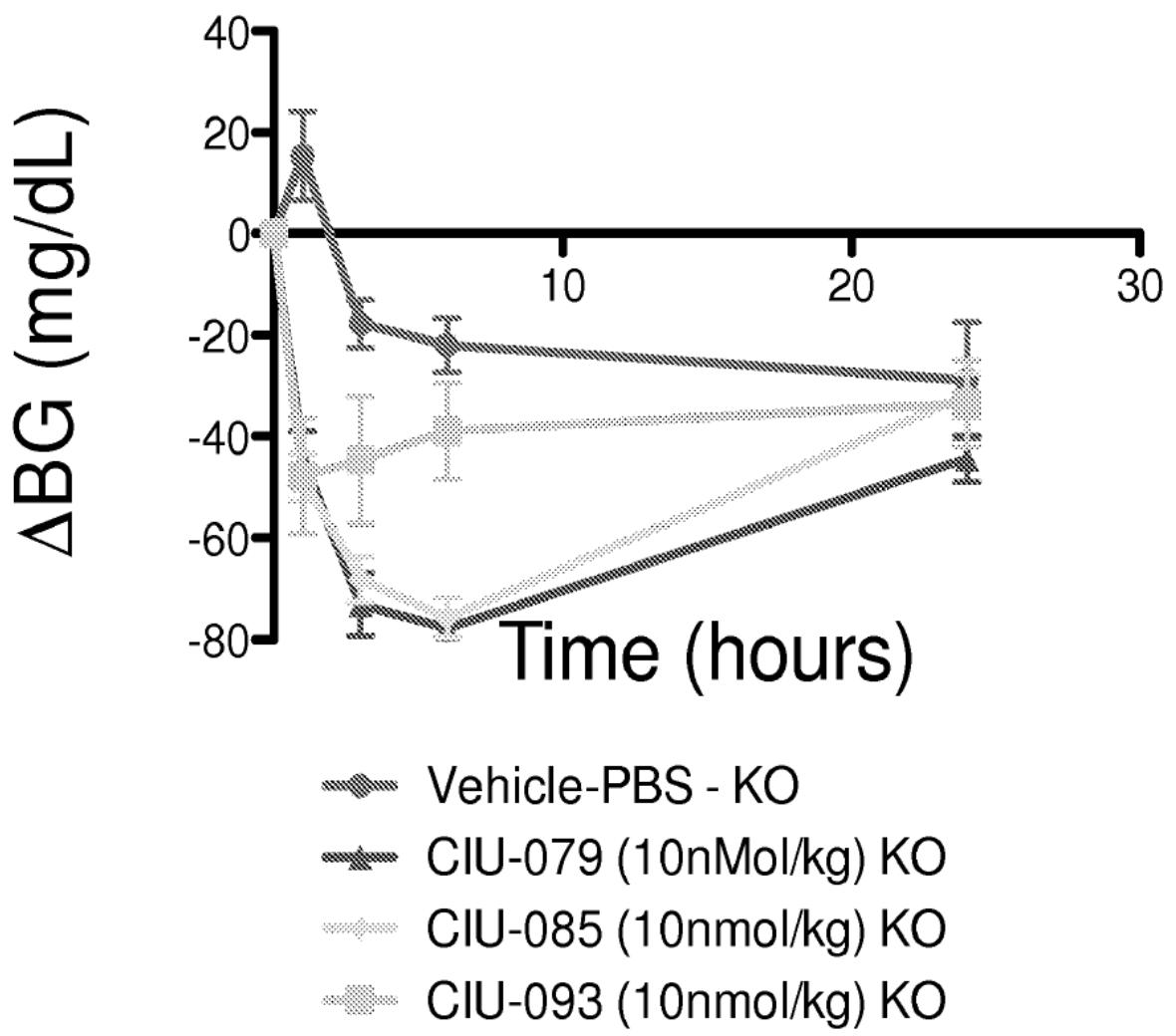
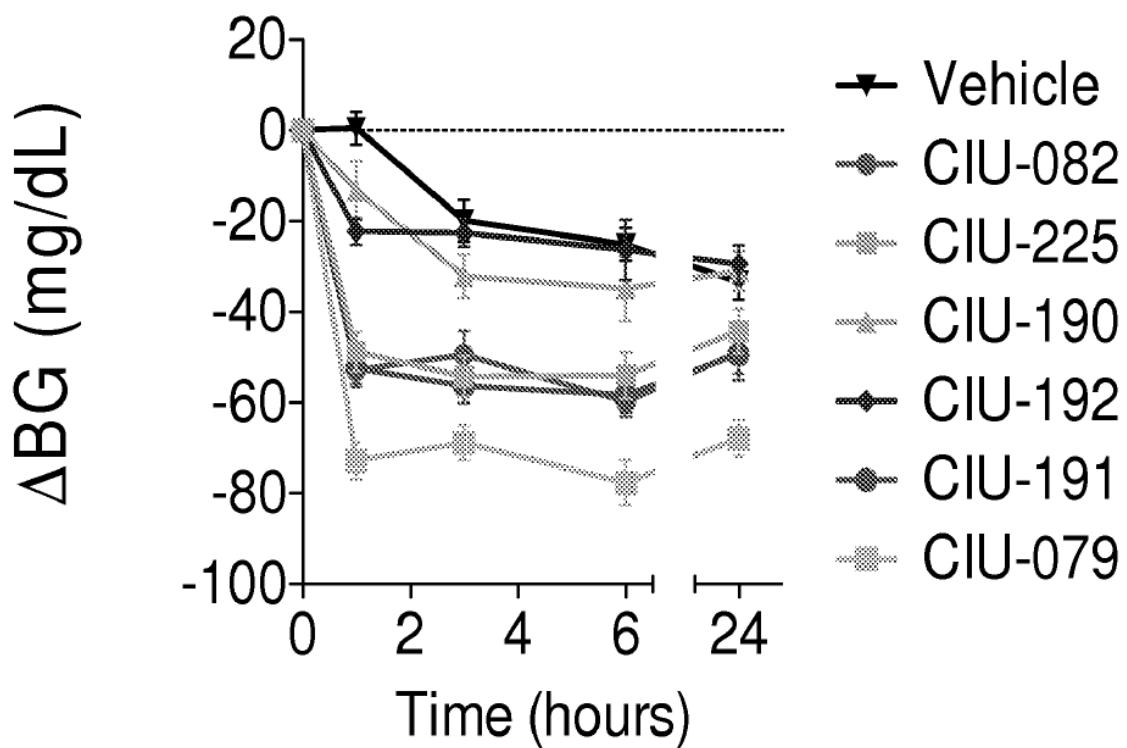


Fig. 33

**Fig. 34**

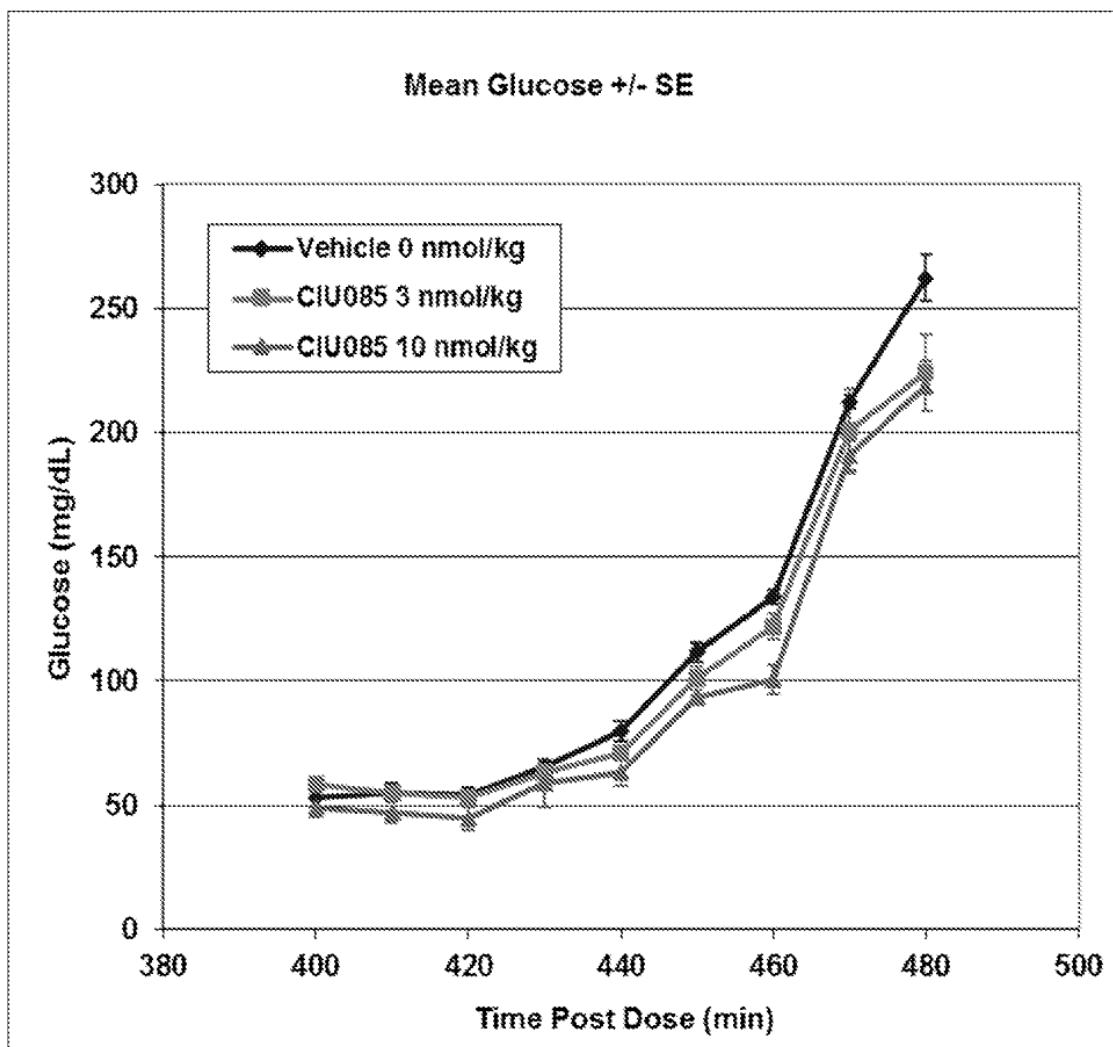


Fig. 35A

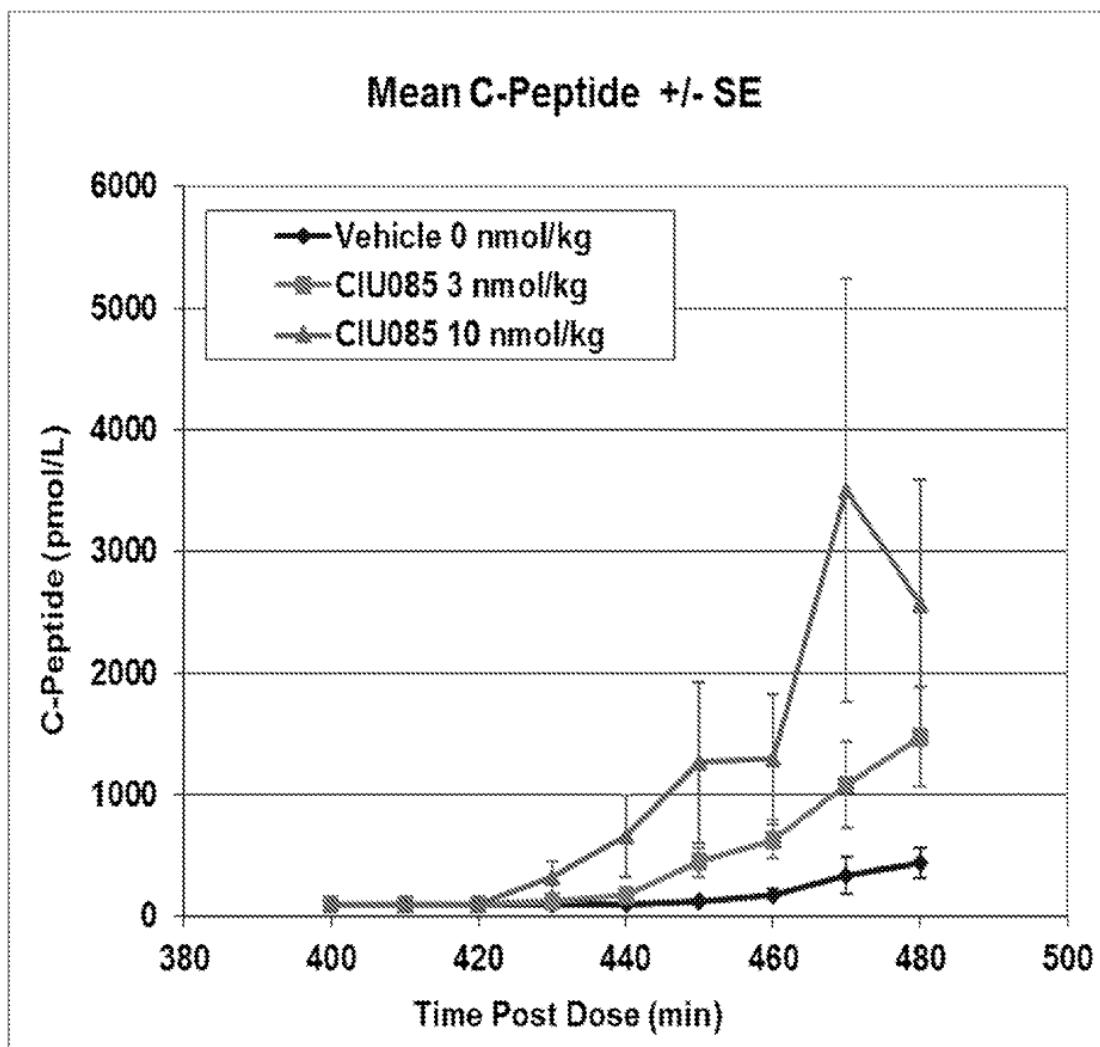


Fig. 35B

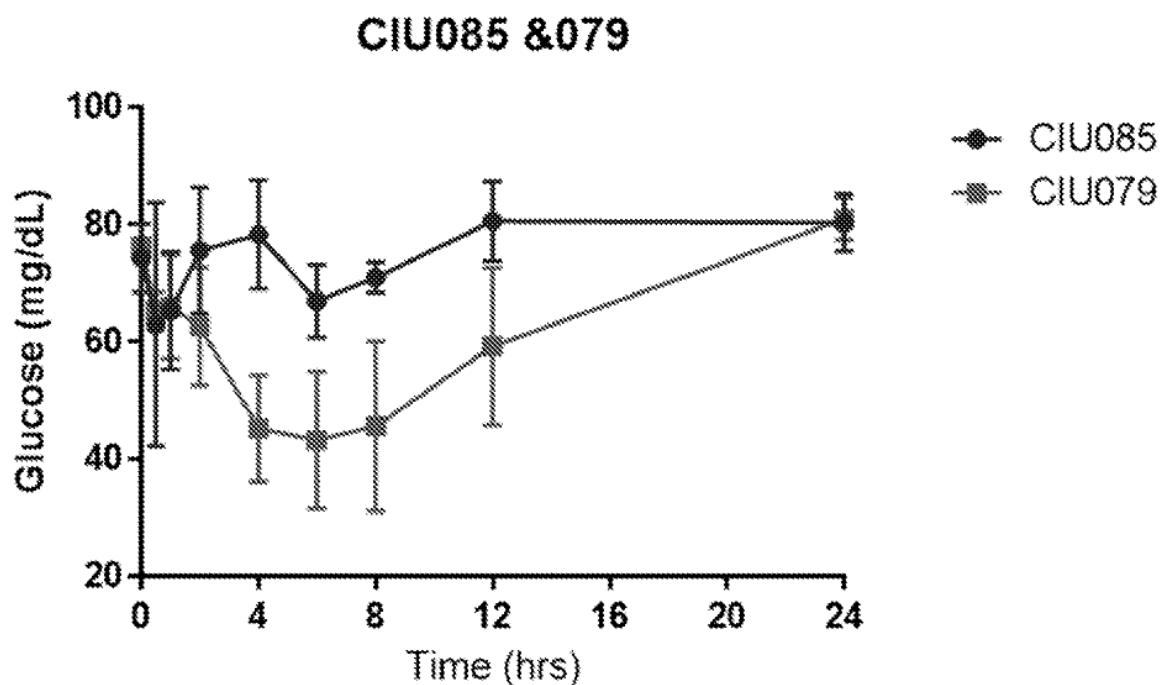


Fig. 36

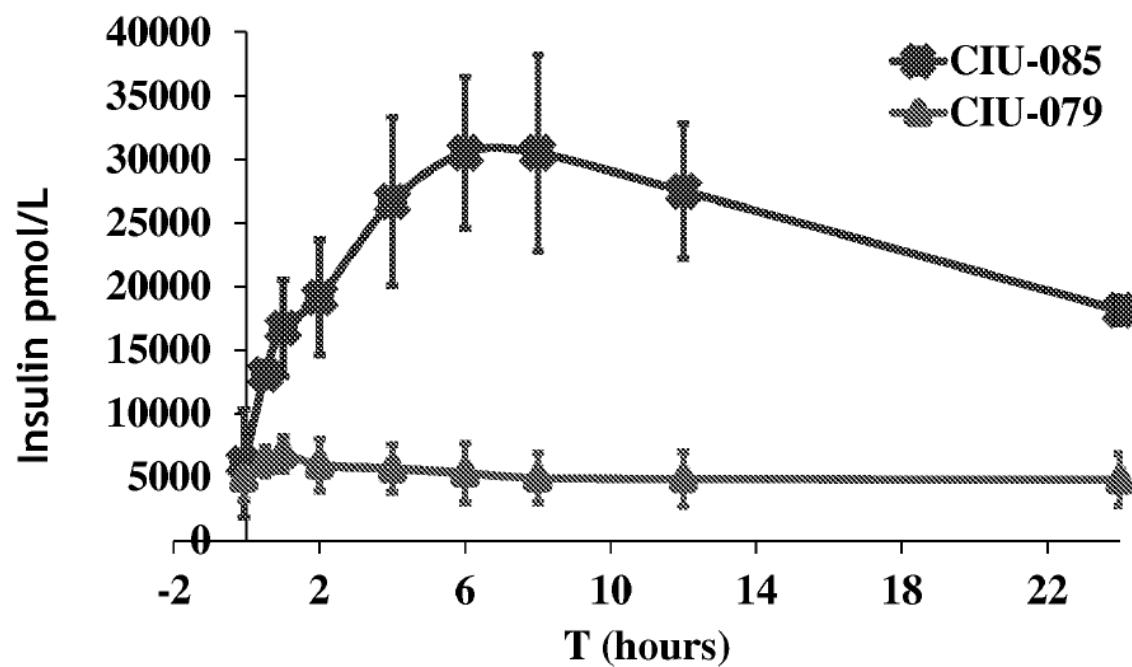


Fig. 37