

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 976 562**

(51) Int. Cl.:

C07K 14/605 (2006.01)
A61K 38/26 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/08 (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2015 E 19172184 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3575314**

(54) Título: **Derivado del glucagón**

(30) Prioridad:

30.12.2014 KR 20140193800

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.08.2024

(73) Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
214 Muha-ro Paltan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, KR**

(72) Inventor/es:

**KIM, JUNG KUK;
LEE, JONG MIN;
KIM, SANG YUN;
BAE, SUNG MIN;
JUNG, SUNG YOUB y
KWON, SE CHANG**

(74) Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

Observaciones:

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

ES 2 976 562 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

Derivado del glucagón

5 [Campo técnico]

La presente invención se refiere a un nuevo derivado del glucagón que tiene propiedades físicas mejoradas debido al cambio en el punto isoelectrónico (pI), y la divulgación se refiere a una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de la hipoglucemia y la obesidad que contiene el mismo como ingrediente activo.

10

[Antecedentes de la técnica]

15

Los recientes avances económicos y los cambios en el estilo de vida han ido acompañados de grandes cambios en los hábitos alimentarios. En particular, las personas ocupadas de hoy en día padecen sobrepeso y obesidad debido a dietas hipocalóricas y ejercicio insuficiente. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha informado de que más de mil millones de adultos tienen sobrepeso en todo el mundo, entre ellos más de tres millones están diagnosticados clínicamente de obesidad grave, y 25.000 personas mueren cada año de enfermedades relacionadas con el sobrepeso o la obesidad (Organización Mundial de la Salud, Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud, 2004).

20

El sobrepeso y la obesidad son responsables del aumento de la presión arterial y de los niveles de colesterol y causan o empeoran diversas enfermedades, como las enfermedades cardíacas, la diabetes, la artritis, etc. Además, el problema de la obesidad también se está convirtiendo en una de las principales causas del aumento de la incidencia de aterosclerosis, hipertensión, hiperlipidemia o enfermedades cardíacas tanto en niños o adolescentes como en adultos.

25

Sin embargo, la obesidad no es fácil de tratar, ya que se trata de una enfermedad compleja asociada a los mecanismos de control del apetito y del metabolismo energético. En consecuencia, el tratamiento de la obesidad requiere no sólo los esfuerzos del propio paciente, sino también un método capaz de tratar los mecanismos anormales asociados con el control del apetito y el metabolismo energético. Por ello, se ha intentado desarrollar fármacos para tratar los mecanismos anómalos.

30

Como resultado de estos esfuerzos, se han desarrollado fármacos como el Rimonabant (Sanofi-Aventis), la Sibutramina (Abbott), el Contrave (Takeda) y el Orlistat (Roche), pero tienen las desventajas de efectos adversos graves o efectos antiobesidad muy débiles. Por ejemplo, según los informes, el Rimonabant mostró un efecto secundario de trastorno del sistema nervioso central, la Sibutramina y el Contrave mostraron efectos secundarios cardiovasculares, y el Orlistat sólo mostró una pérdida de peso de unos 4 kg cuando se tomó durante 1 año. En consecuencia, no ha habido ningún agente terapéutico para la obesidad que pueda prescribirse con seguridad a los pacientes obesos.

35

Se han realizado muchos estudios exhaustivos para desarrollar nuevos agentes terapéuticos para la obesidad que puedan resolver los problemas de los fármacos convencionales contra la obesidad. Recientemente, los derivados del glucagón han recibido mucha atención. El glucagón es producido por el páncreas cuando los niveles de glucosa en sangre descenden como consecuencia de otros medicamentos o enfermedades, o de deficiencias hormonales o enzimáticas. El glucagón estimula la descomposición del glucógeno en el hígado y facilita la liberación de glucosa para elevar los niveles de glucosa en sangre a un rango normal. Además del efecto de aumentar los niveles de glucosa en sangre, el glucagón suprime el apetito y activa la lipasa hormonosensible de los adipocitos para facilitar la lipólisis, mostrando así un efecto antiobesidad. Sin embargo, el uso del glucagón como agente terapéutico ha sido limitado debido a su baja solubilidad y a su propiedad de precipitarse a pH neutro.

40

Uno de los derivados del glucagón, el péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), se está desarrollando como agente terapéutico para tratar la hiperglucemia en pacientes con diabetes. El GLP-1 tiene las funciones de estimular la síntesis y secreción de insulina, inhibir la secreción de glucagón, ralentizar el vaciado gástrico, aumentar la utilización de la glucosa e inhibir la ingesta de alimentos.

45

El exendin-4, preparado a partir del veneno de lagarto y con una homología de aminoácidos de aproximadamente el 50 % con el GLP-1, también activaba el receptor del GLP-1, reduciendo así la hiperglucemia en pacientes con diabetes. Sin embargo, los fármacos contra la obesidad que contienen GLP-1 presentan efectos secundarios como vómitos y náuseas.

50

Por lo tanto, como alternativa al GLP-1, se ha prestado mucha atención a la oxintomodulina, que puede unirse a ambos receptores de los dos péptidos, el GLP-1 y el glucagón. La oxintomodulina es un péptido preparado a partir de un precursor del glucagón, el preglucagón, y tiene las funciones de inhibir la ingesta de alimentos y aumentar la saciedad del GLP-1, y tiene actividad lipolítica como el glucagón, lo que aumenta su potencia en la terapia contra la obesidad.

55

Sin embargo, la oxintomodulina o sus derivados tienen el grave inconveniente de que debe administrarse diariamente una cantidad excesiva del fármaco para el tratamiento de la obesidad, ya que tienen una eficacia baja y una semivida *in vivo* corta.

Además, cuando ambas actividades de GLP-1 y glucagón están presentes en un solo péptido, la proporción de actividad del mismo se vuelve fija, y por lo tanto es difícil usar un agonista dual con varias proporciones. Por consiguiente, una terapia combinada capaz de utilizar diversas proporciones de actividad ajustando los contenidos de GLP-1 y glucagón puede ser más eficaz.

- 5 Sin embargo, para la terapia combinada, se requiere mejorar las características físicas del glucagón, que se agrega a un pH neutro y precipita con el tiempo, mostrando así una solubilidad deficiente.
- 10 En estas circunstancias, los presentes inventores han desarrollado derivados del glucagón con modificaciones parciales de la secuencia de aminoácidos del glucagón para la mejora de los efectos terapéuticos del glucagón en la hipoglucemia y la obesidad mediante la mejora de las propiedades físicas del glucagón, y han descubierto que estos derivados del glucagón tienen una solubilidad mejorada y una mayor estabilidad a un pH neutro, completando así la presente invención.
- 15 El documento WO2012/169798 divulga derivados del glucagón que se utilizan para tratar la obesidad. Se demostró que el derivado del glucagón consistente en la SEQ ID NO: 31 tiene actividad en el GLP-1R y el GCGR y muestra un único desajuste K<->C en la posición 17 en comparación con la SEQ ID NO: 20 de la presente invención.

[Divulgación]

20 [Problema técnico]

Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo derivado de glucagón con propiedades físicas mejoradas.

25 [Solución técnica]

La invención se expone en el juego de reivindicaciones adjunto.

30 Para lograr el objeto anterior, la presente invención proporciona un derivado de glucagón novedoso que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20.

35 Se divultan en el presente documento, pero no se reivindican aparte de los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20, los derivados de glucagón que incluyen la secuencia de aminoácidos de la siguiente Fórmula General 1 y tienen un punto isoeléctrico (pI), que no es el mismo, es decir, diferente, que el del glucagón nativo:

X 1-X2-Q GTF-X7-SDY S -X 12-X 13 -X 14-X 15 -X 16-X 17-X 18-X 19-X20-X21-F-X23 -X2 4-W-L-X27-X28-T
(Fórmula general 1)

- 40 en la que, en la fórmula general 1
X1 es histidina, desamino-histidina, N-dimetil-histidina, ácido β -hidroxiimidazopropiónico, ácido 4-imidazoacético, ácido β -carboxiimidazopropiónico, triptófano, tirosina o suprimido;
X2 es ácido α -metil-glutámico, ácido α -aminoisobutírico (Aib), D-alanina, glicina, Sar(N-metilglicina), serina o D-serina;
- 45 X7 es treonina o valina;
X12 es lisina o cisteína;
X13 es tirosina o cisteína;
X14 es leucina o cisteína;
X15 es ácido aspártico, ácido glutámico o cisteína;
- 50 X16 es ácido glutámico, ácido aspártico, serina, ácido α -metil-glutámico o cisteína;
X17 es ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, lisina, arginina, serina, valina o cisteína;
X18 es ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, arginina o cisteína;
X19 es alanina o cisteína;
- 55 X20 es lisina, ácido glutámico, glutamina, ácido aspártico, lisina o cisteína;
X21 es ácido aspártico, ácido glutámico, valina o cisteína;
X23 es valina o arginina;
X24 es valina, leucina, glutamina o arginina;
X27 es isoleucina o metionina; y
- 60 X28 es arginina o asparagina
(con la salvedad de que cuando la secuencia de aminoácidos de la Fórmula General 1 es idéntica a la SEQ ID NO: 1, queda excluida).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucagón nativo" se refiere al glucagón humano nativo que tiene la secuencia de His-Ser- Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Ph e-Val-Gln-Trp-Leu-Met-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1).

Refiriéndose a la secuencia de la Fórmula General 1 anterior, los aminoácidos proceden del extremo N a la izquierda al extremo C a la derecha según el método convencional de descripción. En consecuencia, cuando se hace referencia a la "posición" de cualquier residuo particular en la secuencia de la Fórmula General 1, debe interpretarse de la misma manera que cuando se hace referencia a cualquier posición en el glucagón nativo u otras moléculas.

5

En toda la especificación de la presente invención, no sólo se utilizan los códigos convencionales de una o tres letras para aminoácidos naturales, sino también los códigos de tres letras generalmente permitidos para otros aminoácidos, como el ácido α -aminoisobutírico (Aib), Sar(N-metilglicina) y ácido α -metil-glutámico.

10 Además, los aminoácidos aquí mencionados se abrevian según las reglas de nomenclatura de la IUPAC- IUB de la siguiente manera:

Alanina	A;	Arginina	R;
Asparagina	N;	Ácido aspártico	D;
Cisteína	C;	Ácido glutámico	E;
Glutamina	Q;	Glicina	G;
Histidina	H;	Isoleucina	I;
Leucina	L;	Lisina	K;
Metionina	M;	Fenilalanina	F;
Prolina	P;	Serina	S;
Treonina	T;	Triptófano	W;
Tirosina	Y; y	Valina	V.

15 Como se usa aquí, el término "péptido" se refiere a un compuesto de dos o más aminoácidos nativos y no nativos o derivados de aminoácidos tales como α -aminoácidos unidos por un enlace peptídico. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "derivado de glucagón" se refiere a un péptido que incluye la secuencia de la SEQ ID NO: 20. Los peptidomiméticos presentan un cambio en el pl en comparación con el del glucagón nativo mediante la modificación de una parte de los aminoácidos del glucagón en forma de sustitución, etc. El derivado de glucagón de la presente invención tiene un punto isoeléctrico diferente al del glucagón nativo mientras mantiene la actividad de un receptor de glucagón. El derivado de glucagón de la presente invención tiene una solubilidad mejorada de la del glucagón nativo a un pH fisiológico manteniendo la actividad del receptor de glucagón.

20 Tal como se utiliza aquí, el término "pl" o "punto isoeléctrico" se refiere al valor de pH en el que una macromolécula como un polipéptido no tiene carga neta (0). En el caso de un polipéptido con varios grupos funcionales cargados, la carga neta del polipéptido total es "0" en un punto en el que el valor de pH es el mismo que el de pl. La carga neta del polipéptido a un pH superior al pl será negativa, mientras que la carga neta del polipéptido a un pH inferior al pl será positiva.

25 Los valores de IP pueden medirse o estimarse mediante un método convencional utilizado en la técnica. Por ejemplo, los valores pl pueden medirse en un gel de gradiente de pH inmovilizado compuesto de poliacrilamida, almidón o agarosa mediante electroforesis isoeléctrica o, por ejemplo, pueden estimarse a partir de una secuencia de aminoácidos utilizando una herramienta pl/MW (http://ex-pasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) en un servidor ExPASy.

30 En una realización específica de la presente invención, el derivado de glucagón que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 20 presenta una solubilidad mejorada en función del pH de una solución debido a la diferencia de su pl con respecto a la del glucagón nativo, manteniendo al mismo tiempo las actividades del receptor de glucagón tal como son, teniendo así una estabilidad química *in vivo* mejorada.

35 Durante la sustitución o adición de aminoácidos, pueden utilizarse no sólo los 20 aminoácidos que se encuentran comúnmente en las proteínas humanas, sino también aminoácidos atípicos o no naturales y sus derivados. Las fuentes comerciales de aminoácidos atípicos pueden incluir Sigma-Aldrich, ChemPep Inc, Genzyme Pharmaceuticals, etc. Los péptidos que incluyen estos aminoácidos y secuencias peptídicas atípicas pueden sintetizarse y comprarse a proveedores comerciales, por ejemplo, American Peptide Company, Bachem (EE.UU.) o Anygen (Corea). Los derivados de aminoácidos, por ejemplo, desaminohistidina, ácido β -hidroximidazopropiónico, ácido 4-imidazoacético o ácido β -carboximidazopropiónico, pueden obtenerse de la misma manera.

40 Dado que el glucagón tiene un pH de aproximadamente 7, es insoluble en una solución que tenga un pH de 6 a 8 y tiende a precipitar a un pH neutro. En una solución acuosa con un pH de 3 o inferior, el glucagón se disuelve en la fase inicial, pero precipita al cabo de una hora formando un gel. Dado que el glucagón gelificado consiste principalmente en fibrillas β -hoja, la administración del glucagón así precipitado a través de una aguja de inyección o inyección intravenosa bloqueará los vasos sanguíneos, y por lo tanto no es adecuado para su uso como agente de inyección. Para retrasar el proceso de precipitación, se suelen utilizar formulaciones ácidas (pH de 2 a 4), con lo que el glucagón puede mantenerse en un estado relativamente no agregado durante un breve periodo de tiempo. Sin embargo, el glucagón puede formar fibrillas muy rápidamente a un pH bajo, por lo que estas formulaciones ácidas deben inyectarse en el momento de la preparación.

Es ampliamente conocido en la técnica que la solubilidad, la actividad y la estabilidad de una proteína en una solución pueden variar en función del pl (Shaw, K. L. et al., Protein Science 10, pp 1206-1215, 2001).

Como tal, los presentes inventores han desarrollado un derivado de glucagón con estabilidad extendida y efectos funcionales modificando la secuencia del glucagón nativo, alterando así su pl. El derivado de glucagón de la presente invención, al tener un pl alterado en comparación con el del glucagón nativo, se caracteriza porque tiene una solubilidad y estabilidad mejoradas en función del pH de una solución dada, en comparación con la del glucagón nativo.

El derivado de glucagón de la presente invención es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20.

El péptido que incluye el derivado de glucagón de la presente invención puede prepararse mediante un método de síntesis estándar, un sistema de expresión recombinante o cualquier otro método de la técnica. En consecuencia, el derivado de glucagón según la presente invención puede sintetizarse por muchos métodos, incluyendo los métodos descritos a continuación:

- (a) un método de síntesis de un péptido mediante un método en fase sólida o líquida por etapas o por ensamblaje de fragmentos, seguido del aislamiento y purificación del producto peptídico final; o
- (b) un método de expresión de una construcción de ácido nucleico que codifica un péptido en una célula huésped y de recuperación del producto de expresión a partir del cultivo de la célula huésped; o
- (c) un método para realizar una expresión *in vitro* libre de células de una construcción de ácido nucleico que codifica un péptido y recuperar el producto de expresión del mismo; o
- (d) un método de obtención de fragmentos peptídicos mediante cualquier combinación de los métodos a), b) y c), obtención del péptido mediante la unión de los fragmentos peptídicos, y posterior recuperación del péptido.

Se confirmó que el derivado de glucagón de la presente invención tiene un pl diferente comparado con el del glucagón nativo (véase la Tabla 1). Como resultado, el derivado de glucagón de la presente invención tiene una solubilidad mejorada y una mayor estabilidad según el pH de una solución dada, en comparación con la del glucagón nativo. Por consiguiente, el derivado de glucagón de la presente invención puede aumentar el cumplimiento del paciente cuando se utiliza como agente hipoglucemiante y también es adecuado para la administración combinada con otros agentes contra la obesidad, por lo que puede utilizarse eficazmente para la prevención y el tratamiento de la hipoglucemia y la obesidad.

A este respecto, el derivado de glucagón de la presente invención puede proporcionar una selección terapéutica atractiva en relación con la hipoglucemia, la obesidad o las enfermedades asociadas a las mismas.

Por ejemplo, el derivado de glucagón de la presente invención es una importante hormona controladora de la respuesta a la insulina, y puede utilizarse eficazmente para el tratamiento de la hipoglucemia grave en pacientes diabéticos.

Además, el derivado de glucagón de la presente invención puede utilizarse como fármaco no sólo para prevenir el aumento del peso corporal, promover la disminución del peso corporal, reducir el sobrepeso y la obesidad, incluida la obesidad mórbida (p. ej., mediante el control del apetito, la ingestión, la ingesta de alimentos, la ingesta de calorías y/o el consumo de energía), sino también para tratar la inflamación relacionada con la obesidad, la enfermedad de la vesícula biliar relacionada con la obesidad y la apnea del sueño inducida por la obesidad, pero no se limita a ello, y puede utilizarse para tratar las enfermedades o afecciones asociadas a las mismas. El derivado de glucagón de la presente invención también puede usarse para tratar las afecciones de salud que pueden estar asociadas con la obesidad, como el síndrome metabólico, la hipertensión, la dislipidemia inducida por aterosclerosis, la arteriosclerosis, la fle-rosis arterial, la cardiopatía coronaria, los accidentes cerebrovasculares, etc. Sin embargo, los efectos del derivado del glucagón según la presente invención pueden estar mediados total o parcialmente por los efectos relacionados con el peso corporal descritos anteriormente o pueden ser independientes de los mismos.

Mientras tanto, para la mejora de los efectos terapéuticos del derivado de glucagón de la presente invención, el derivado de glucagón puede modificarse utilizando las técnicas típicas en el arte, incluyendo una modificación con polímeros tales como polietilenglicol (PEG) y cadenas de azúcar, o una fusión con albúmina, transferrina, ácido graso e inmunoglobulina, etc. Por ejemplo, al menos una cadena lateral de aminoácidos de los compuestos de la presente invención puede unirse a un polímero para aumentar la solubilidad *in vivo* y/o la semivida, y/o aumentar su biodisponibilidad. Se sabe que estas modificaciones reducen la eliminación de proteínas y péptidos terapéuticos.

Para estos polímeros, son apropiados polímeros solubles (anfipáticos o hidrofilicos), no tóxicos y farmacéuticamente inertes, y preferiblemente, pueden incluir PEG, homopolímeros o copolímeros de PEG, polímeros monometil-sustituidos (mPEG), y poli-aminoácidos tales como poli-lisina, ácido poli-aspártico, y ácido poli-glutámico.

Las versiones modificadas del derivado de glucagón descritas anteriormente también pertenecen al ámbito de la presente invención.

Una composición farmacéutica para su uso en la prevención o el tratamiento de la hipoglucemia o la obesidad puede

contener el derivado de glucagón de la presente invención.

Como se usa aquí, el término "prevención" se refiere a cualquier acción que resulte en la supresión o retraso de la aparición de la obesidad por la administración de los derivados del glucagón o la composición farmacéutica, y el término "tratamiento" se refiere a cualquier acción que resulte en la mejora de los síntomas de la obesidad o la alteración beneficiosa por la administración del derivado del glucagón o la composición farmacéutica.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración" se refiere a la introducción de un material concreto a un paciente de una manera adecuada, y la composición puede administrarse a través de cualquiera de las vías habituales siempre que la composición pueda llegar a un tejido diana. Por ejemplo, la administración puede realizarse por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar, intrarrectal, etc.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "hipoglucemia" se refiere a un síntoma agudo de la diabetes, en el que los niveles de glucosa en sangre son inferiores a los de las personas normales y, en general, se refiere a un estado en el que los niveles de glucosa en sangre son de 50 mg/dL o menos. La hipoglucemia se produce con frecuencia cuando una persona que toma un hipoglucemiantre oral ha comido menos de lo habitual o ha realizado actividades o ejercicios más de lo habitual. Además, la hipoglucemia puede producirse debido al uso de fármacos reductores del nivel de glucosa, enfermedades físicas graves, deficiencia de hormonas como las adrenocorticales y el glucagón, tumor en el páncreas productor de insulina, síndrome autoinmune a la insulina, pacientes con gastrectomía, trastorno por error congénito del metabolismo de los hidratos de carbono, etc.

Los síntomas de hipoglucemia incluyen debilidad, temblores, piel pálida, sudor frío, mareos, excitación, ansiedad, palpitaciones, estómago vacío, dolor de cabeza, fatiga, etc. En caso de hipoglucemia persistente, puede provocar convulsiones o ataques, y puede causar shock y, por tanto, desmayos.

Tal y como se utiliza en el presente documento, el término "obesidad" hace referencia a una afección médica con exceso de grasa corporal en el cuerpo, y cuando se diagnostica que una persona tiene un índice de masa corporal (IMC; masa corporal (kg) dividida por el cuadrado de la altura corporal (m)) de 25 o superior. Por lo general, la obesidad se produce debido a un desequilibrio energético a largo plazo en el que la ingesta de energía supera el gasto energético. La obesidad es una enfermedad metabólica que afecta a todo el organismo, lo que aumenta el riesgo de diabetes, hiperlipidemia, disfunción sexual, artritis y enfermedades cardiovasculares y, en algunos casos, también se asocia a la aparición de cánceres.

Una composición farmacéutica puede contener un portador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza aquí, el término "farmacéuticamente aceptable" se refiere a las propiedades de tener una cantidad suficiente para exhibir un efecto terapéutico y no causar efectos adversos, y puede determinarse fácilmente por un experto en la materia basándose en los factores bien conocidos en el campo médico, como el tipo de enfermedad, la edad, el peso corporal, el estado de salud, el sexo, la sensibilidad al fármaco de un paciente, la vía de administración, el método de administración, la frecuencia de administración, la duración del tratamiento, un fármaco que debe mezclarse o administrarse simultáneamente en combinación, etc.

Una composición farmacéutica que contiene el derivado de glucagón de la presente invención puede contener además un portador farmacéuticamente aceptable. El portador farmacéuticamente aceptable puede incluir, para administración oral, un aglutinante, un deslizante, un desintegrante, un excipiente, un agente solubilizante, un dispersante, un agente estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante, un agente aromatizante, etc.; para inyecciones, un agente amortiguador, un agente conservante, un analgésico, un agente solubilizante, un agente isotónico, un agente estabilizante, etc., que pueden combinarse para su uso; y para administraciones tópicas, una base, un excipiente, un lubricante, un agente conservante, etc., aunque sin limitarse a ellos.

El tipo de formulación de la composición puede prepararse de diversas maneras combinándola con un portador farmacéuticamente aceptable, como se ha descrito anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición puede formularse en comprimidos, troques, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, etc. Para inyecciones, la composición puede formularse en ampollas monodosis o envases multidosis. La composición también puede formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas y formulaciones de liberación sostenida.

Mientras tanto, ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábigo, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc. Además, la composición puede contener un relleno, un anticoagulante, un lubricante, un humectante, un agente aromatizante, un conservante, etc.

Además, la composición farmacéutica puede prepararse en cualquier tipo de formulación seleccionada del grupo que consiste en comprimidos, píldoras, polvos, gránulos, cápsulas, suspensiones, medicamentos líquidos para uso interno, emulsiones, jarabes, soluciones inyectables estériles, disolventes no acuosos, formulaciones liofilizadas y supositorios.

- Además, la composición puede formularse en una forma de dosificación única adecuada para el organismo del paciente, y preferiblemente se formula en un preparado útil para fármacos peptídicos según el método típico en el campo farmacéutico para ser administrado por vía oral o parenteral, como por vía cutánea, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, pulmonar, transdérmica, subcutánea, intraperitoneal, intranasal, 5 intragástrica, tópica, sublingual, vaginal o rectal, pero sin limitarse a ellas.
- Además, el derivado de glucagón puede utilizarse mezclado con una variedad de portadores farmacéuticamente aceptables, como solución salina fisiológica o disolventes orgánicos. Para aumentar la estabilidad o la capacidad de absorción, pueden utilizarse hidratos de carbono como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes como ácido 10 ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizadores.
- La dosis y la frecuencia de administración de la composición farmacéutica vienen determinadas por el tipo de principio(s) activo(s), junto con diversos factores como la enfermedad a tratar, la vía de administración, la edad, el sexo y el peso corporal del paciente, y la gravedad de la enfermedad.
- 15 La dosis efectiva total de la composición puede administrarse a un paciente en una dosis única, o puede administrarse durante un largo período de tiempo en dosis múltiples según un protocolo de tratamiento fraccionado. En la composición farmacéutica, el contenido de principio(s) activo(s) puede variar en función de la gravedad de la enfermedad. Preferiblemente, la dosis diaria total del péptido de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,0001 mg a 20 500 mg por 1 kg de peso corporal de un paciente. Sin embargo, la dosis eficaz del derivado del glucagón se determina teniendo en cuenta diversos factores, como la edad del paciente, el peso corporal, las condiciones de salud, el sexo, la gravedad de la enfermedad, la dieta y la tasa de excreción, además de la vía de administración y la frecuencia de tratamiento de la composición farmacéutica. A este respecto, los expertos en la materia pueden determinar fácilmente la dosis eficaz adecuada para el uso particular de la composición farmacéutica.
- 25 Una composición farmacéutica que comprende el derivado de glucagón de la presente invención muestra una excelente duración *in vivo* de la eficacia y el título, lo que reduce notablemente el número y la frecuencia de administración del mismo.
- 30 En particular, dado que la composición farmacéutica que comprende el derivado de glucagón de la presente invención contiene, como ingrediente activo, un derivado de glucagón que tiene un pI alterado diferente del del glucagón nativo, muestra una solubilidad mejorada y una alta estabilidad según el pH de una solución dada, y por lo tanto la composición farmacéutica puede usarse eficazmente en la preparación de una formulación estable de glucagón para tratar la hipoglucemias o la obesidad.
- 35 40 Además, la composición farmacéutica puede administrarse sola o en combinación con otra(s) formulación(es) farmacéutica(s) que muestre(n) efectos profilácticos o terapéuticos sobre la obesidad. Además, la composición farmacéutica puede contener otra formulación farmacéutica que muestre efectos profilácticos o terapéuticos sobre la obesidad.
- 45 Las formulaciones farmacéuticas que muestran efectos profilácticos o terapéuticos sobre la obesidad no están particularmente limitadas, y pueden incluir un agonista del receptor GLP-1, un antagonista del receptor del péptido insulíntrópico dependiente de la glucosa (GIP), un agonista del receptor de la leptina, un inhibidor DPP-IV, un antagonista del receptor Y5, un antagonista del receptor de la hormona concentradora de melanina (MCH), un agonista del receptor Y2/3/4, un agonista del receptor MC3/4, un inhibidor de la lipasa gástrica/pancreática, un agonista 5HT2c, un agonista del receptor β3A, un agonista del receptor de amilina, un antagonista de la grelina y un antagonista del receptor de la grelina, FGF1, un agonista del receptor del FGF21, un agonista del receptor de la colecistoquinina (CCK), un agonista del receptor del polipéptido pancreático (PP), un inhibidor de la reabsorción de dopamina, etc.
- 50 El derivado de glucagón de la presente invención puede utilizarse en un método para prevenir o tratar la hipoglucemias o la obesidad, incluyendo la administración del derivado de glucagón a un sujeto.
- Como se usa aquí, el término "sujeto" se refiere a aquellos sospechosos de tener hipoglucemias u obesidad, que son mamíferos incluyendo humanos, ratones y animales de ganado que tienen hipoglucemias u obesidad, o con la posibilidad 55 de tener hipoglucemias u obesidad. Sin embargo, se incluye sin limitación cualquier sujeto a tratar con el derivado de glucagón de la presente invención. El derivado de glucagón de la presente invención puede administrarse a un sujeto con sospecha de hipoglucemias u obesidad, tratando así eficazmente al sujeto. La hipoglucemias y la obesidad son las mismas que las descritas anteriormente.
- 60 65 El derivado del glucagón puede administrarse en una cantidad farmacéuticamente eficaz. Preferiblemente, la dosis diaria total se determinará basándose en el juicio médico apropiado por parte de un médico y se administrará una o varias veces. A la vista de los objetivos de la presente invención, la dosis terapéuticamente eficaz específica para un paciente concreto puede variar en función de diversos factores, como el tipo y el grado de la respuesta que se desea conseguir, las composiciones específicas, incluido el uso o no de otro(s) agente(s), la edad, el peso corporal, el estado de salud, el sexo y la dieta del paciente, el momento y la vía de administración, la tasa de secreción de la composición, la duración de la terapia, otro(s) fármaco(s) utilizado(s) en combinación o simultáneamente con las composiciones

específicas, y factores similares bien conocidos en el arte médico.

[Efectos ventajosos]

- 5 El novedoso derivado de glucagón de la presente invención tiene una excelente estabilidad y solubilidad según el pH de una solución dada al tener un pI diferente al del glucagón nativo. Por lo tanto, cuando el derivado de glucagón novedoso de la presente invención se utiliza como agente terapéutico para tratar la hipoglucemia, puede aumentar el cumplimiento del paciente.
- 10 Además, el nuevo derivado de glucagón de la presente invención es adecuado para la administración en combinación con otros agentes contra la obesidad, y por lo tanto puede ser utilizado eficazmente para prevenir o tratar la hipoglucemia y la obesidad.

[DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN]

- 15 A continuación, la presente invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos Ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente invención, que se define por las reivindicaciones adjuntas, limitando la protección a un derivado de glucagón que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20.

20 **Ejemplo 1: Producción de una línea celular con respuesta AMPc al glucagón**

La PCR se llevó a cabo utilizando una región correspondiente a un marco de lectura abierto (ORF) de ADNc (OriGene Technologies, Inc., EE.UU.) del gen receptor de glucagón humano como plantilla, y los siguientes cebadores directo e inverso de SEQ ID NOS: 35 y 36, incluyendo cada uno de los sitios de restricción HindIII y EcoRI.

25 En particular, la PCR se realizó durante un total de 30 ciclos utilizando las siguientes condiciones: Desnaturalización a 95°C durante 60 segundos, recocido a 55°C durante 60 segundos y extensión a 68°C durante 30 segundos. El producto de PCR así obtenido se electroforizó en un gel de agarosa al 1,0 %, y se obtuvo una banda con un tamaño de 450 pb por elución.

Cebador directo: 5'-CAGCGACACCGACCCTCCCGTACTTAAGGCC-3' (SEQ ID NO: 35)
 Cebador inverso: 5'-CTAACCGACTCTGGGAAAGACTGAGCTGCC-3' (SEQ ID NO: 36)

30 35 El producto PCR se clonó en un vector de expresión de células animales conocido, x0GC/dhfr, para preparar un vector recombinante x0GC/GCGR. La línea celular CHO DG44 cultivada en medio DMEM/F12 (10 % FBS) se transfeció con el vector recombinante x0GC/GCGR utilizando Lipofectamine, y se cultivó selectivamente en un medio de selección que contenía 1 mg/mL de G418 y 10 nM de Metotraxato. Se seleccionaron líneas celulares clónicas individuales mediante un método de dilución límite y, entre ellas, se seleccionó finalmente una línea celular que mostraba una excelente respuesta del AMPc al glucagón en función de la concentración.

40 **Ejemplo 2: Síntesis de derivados del glucagón**

45 Es ampliamente conocido en la técnica que la solubilidad, la actividad y la estabilidad de una proteína en una solución pueden variar en función del pI (Shaw, K. L. et al., Protein Science 10, pp 1206-1215, 2001). Para preparar derivados de glucagón con propiedades físicas mejoradas, la secuencia de aminoácidos del glucagón nativo representada por la SEQ ID NO: 1 se sustituyó con residuos de aminoácidos que tenían cargas positivas y negativas, y así se sintetizaron derivados de glucagón como se muestra en la Tabla 1 a continuación.

50 **[Tabla 1]**

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Formación de anillos
SEQ ID NO: 1	HSQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 2	HSQGTFTSDYSKYLDCDRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 3	HSQGTFTSDYSKYLDCERAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 4	HSQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 5	HSQGTFTSDYSKYLDSCAEQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 6	HSQGTFTSDYSKYLDSCAEADDVFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 7	YSQGTFTSDYSKYLDSCAEADDVFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 8	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVQWLINT	-
SEQ ID NO: 9	YXQGTFTSDYSKYLDSCDAQDFVVWLINT	-
SEQ ID NO: 10	YXQGTFTSDYSKYLDSCADDVFVWLINT	-
SEQ ID NO: 11	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 12	YXQGTFTSDYSKYLDSSRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 13	YXQGTFTSDYSCYLDEKRAKEFVQWLMNT	-

(continuación)

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Formación de anillos
SEQ ID NO: 14	YXQGTFTSDYSKYLDCKRAKEFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 15	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAQDFVQWLMNT	-
SEQ ID NO: 16	YXQGTFTSDYSKYLDCRRAQVFVQWLMRT	-
SEQ ID NO: 17	YXQGTFTSDYSKYLDCVRAQDFVQWLMRT	-
SEQ ID NO: 18	YXQGTFTSDYSKYLDSRRACDFRLWLMNT	-
SEQ ID NO: 19	YXQGTFTSDYSKYLCEKRAKEFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 20	YXQGTFTSDYSKYLDECRAKEFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 21	YXQGTFTSDYSKYLDEKCAKEFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 22	YXQGTFTSDYSKYLDEKRCKEKFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 23	YXQGTFTSDYSKYCDEKRAKEFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 24	YXQGTFTSDYSKCLDEKRAKEFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 25	YXQGTFTSDYSKYLDEKRAKCFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 26	WXQGTFTSDYSKYLDECRAKDFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 27	YXQGTFVSDYSKYLDECRAKDFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 28	WXQGTFVSDYSKYLDECRAKDFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 29	YXQGTFTSDYSKCLDERRAKDFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 30	WXQGTFTSDYSKCLDERRAKDFVQWLMNT	anillo formado
SEQ ID NO: 31	YXQGTFTSDYSKYLDC <u>KRAKEFVQWLMNT</u>	anillo formado
SEQ ID NO: 32	-SQGTFTSDYSKYLDE <u>CRAKEFVQWLMNT</u>	anillo formado
SEQ ID NO: 33	WXQGTFTSDYSKYCD <u>ERRAKEFVQWLMNT</u>	anillo formado
SEQ ID NO: 34	YXQGTFTSDYSKYCD <u>ERRAKEFVQWLMNT</u>	anillo formado

En cuanto a los SEQ ID NO: 8 a 31 y 33 a 34 mostrados en la Tabla 1, el aminoácido representado por X representa un aminoácido no nativo, el ácido α -aminoisobutírico (Aib); "-" en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32 significa que no hay ningún residuo de aminoácido presente en la posición correspondiente; y los dos residuos de aminoácidos en negrita y subrayados representan la formación de un anillo entre los dos residuos de aminoácidos.

5

Ejemplo 3: Medición del pl de los derivados del glucagón

Para medir las propiedades físicas mejoradas de los derivados de glucagón sintetizados en el Ejemplo 2, se calcularon los valores pl basándose en las secuencias de aminoácidos utilizando la herramienta pl/Mw (http://expasy.org/tools/pi_tool.html; Gasteiger et al., 2003) en el servidor ExPASy.

[Tabla 2]

Derivados del glucagón	pl
SEQ ID NO: 1	6,8
SEQ ID NO: 2	4,56
SEQ ID NO: 3	4,66
SEQ ID NO: 4	4,13
SEQ ID NO: 5	4,22
SEQ ID NO: 6	4,03
SEQ ID NO: 7	3,71
SEQ ID NO: 8	3,77
SEQ ID NO: 9	3,77
SEQ ID NO: 10	3,66
SEQ ID NO: 11	4,78
SEQ ID NO: 12	6,04
SEQ ID NO: 13	4,78
SEQ ID NO: 14	8,12
SEQ ID NO: 15	6,11
SEQ ID NO: 16	9,11
SEQ ID NO: 17	6,03
SEQ ID NO: 18	8,15
SEQ ID NO: 19	8,12
SEQ ID NO: 20	4,78
SEQ ID NO: 21	4,78
SEQ ID NO: 22	6,20
SEQ ID NO: 23	6,20

(continuación)

Derivados del glucagón	pI
SEQ ID NO: 24	6,21
SEQ ID NO: 25	8,12
SEQ ID NO: 26	4,68
SEQ ID NO: 27	4,68
SEQ ID NO: 28	4,68
SEQ ID NO: 29	6,15
SEQ ID NO: 30	4,44
SEQ ID NO: 31	8,12
SEQ ID NO: 32	4,78
SEQ ID NO: 33	6,21
SEQ ID NO: 34	6,21

Como se muestra en la Tabla 2 anterior, mientras que el glucagón nativo de la SEQ ID NO: 1 tenía un pI de 6,8, el derivado de glucagón según la presente invención (que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20) mostró un valor pI de 4,78, mostrando así propiedades físicas mejoradas. Dado que el derivado de glucagón según la presente invención tiene un valor pI diferente al del glucagón nativo, puede mostrar una solubilidad mejorada y una mayor estabilidad según las condiciones de pH de una solución dada.

Por consiguiente, cuando el derivado de glucagón según la presente invención se utiliza como agente terapéutico para tratar la hipoglucemia, puede mejorar el cumplimiento del paciente, y también es adecuado para la administración en combinación con otros agentes contra la obesidad, por ejemplo, un antagonista del receptor de GLP-1, un antagonista del receptor insulíntrópico dependiente de la glucosa (GIP), etc., y por lo tanto puede utilizarse eficazmente como agente terapéutico para tratar la hipoglucemia y la obesidad.

Las realizaciones descritas deben considerarse en todos los aspectos únicamente como ilustrativas y no restrictivas. El alcance de la presente invención está, por tanto, indicado por las reivindicaciones adjuntas más que por la descripción precedente.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado del glucagón que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 20.
- 5 2. El derivado de glucagón de la reivindicación 1, en el que el derivado de glucagón tiene actividad estimulante del receptor de glucagón.