

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 880**

51 Int. Cl.:

A61K 38/26 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 31/56 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.11.2012 PCT/US2012/065492**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.05.2013 WO13074910**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.11.2012 E 12849285 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2780031**

54 Título: **Péptidos de la superfamilia de glucagón que muestran actividad de receptor de glucocorticoides**

30 Prioridad:

17.11.2011 US 201161561094 P

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

18.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DIMARCHI, RICHARD D. y
YANG, BIN**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

Observaciones :

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

ES 2 672 880 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

Péptidos de la superfamilia de glucagón que muestran actividad de receptor de glucocorticoides

5 **Campo de la descripción**

[0001] Esta invención proporciona péptidos de la superfamilia del glucagón conjugados con ligandos de receptores de glucocorticoides que son capaces de actuar en los receptores de glucocorticoides.

10 **Breve descripción de la tecnología relacionada**

[0002] Las proteínas de receptores nucleares de hormonas forman una clase de proteínas activadas por ligando que, cuando se unen a secuencias específicas de ADN, sirven como interruptores on-off para la transcripción dentro del núcleo de la célula. Estos interruptores controlan el desarrollo y la diferenciación de la piel, los huesos y los centros de comportamiento en el cerebro, así como la regulación continua de los tejidos reproductivos.

[0003] Los ligandos de receptores nucleares de hormonas, tales como los esteroides, esteroides, retinoides, hormonas tiroideas, y vitamina D funcionan para activar los receptores nucleares de hormonas. La interacción de la hormona y el receptor desencadena un cambio conformacional en el receptor, lo que resulta en la regulación por incremento de la expresión génica. El nivel de la transducción de señal celular activada por la interacción de un ligando y un receptor nuclear de hormona se determina por el número de ligandos y receptores disponibles para la unión, y por la afinidad de unión entre el ligando y el receptor. Muchos ligandos y análogos correspondientes que se unen a receptores nucleares de hormonas se utilizan como medicamentos para tratar, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson (NURR1), trastornos del sueño (RZRbeta), artritis y ataxia cerebelosa (ROR α), trastornos del sistema nervioso central (NOR-1, Rev-ErbA β , T1x, NGFI-B β , HZF-2 α , COUP-TF α , COUP-TF β , COUR-TF γ , NUR77), hipercolesterolemia (LXR α , COR), obesidad (Rev-ErbA α), diabetes (HNF4 α), trastornos inmunitarios (TOR), trastornos metabólicos (MB67 α , SHP, FXR, SF-1, LXR β), y la infertilidad y la anticoncepción (GCNF, TR2-11 α , β , TR4, ER α , β ERR α , β).

[0004] El pre-proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que se procesa en diferentes tejidos para formar un conjunto de diferentes péptidos derivados de proglucagón, incluyendo glucagón, péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), péptido similar al glucagón 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM), que están involucrados 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 glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 33 a 61 de pre-proglucagón, mientras que el GLP-1 se produce como un péptido de 37 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 72 a 108 de pre-proglucagón. GLP-1 (7-36) amida o GLP-1 (7-37) ácido son formas biológicamente potentes de GLP-1, que demuestran actividad esencialmente equivalente en el receptor de GLP-1.

[0005] El glucagón se utiliza en el tratamiento agudo de hipoglucemia grave. Se ha descrito que la oxintomodulina tiene la capacidad farmacológica para suprimir el apetito y disminuir el peso corporal. Los agonistas de receptores de GLP-1 y GLP-1 se utilizan como tratamiento para la diabetes Tipo II. La exendina-4 es un péptido presente en la saliva del monstruo de Gila que se asemeja a GLP-1 en la estructura, y como el glucagón y el GLP-1, aumenta la liberación de insulina.

[0006] El polipéptido inhibidor gástrico (GIP) también se conoce como un péptido insulínico dependiente de 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 de GIP y circula como un péptido biológicamente activo de 42 aminoácidos. El gen de GIP se expresa en el intestino delgado, así como 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, el GIP aumenta la liberación de insulina por las células beta de los islotes pancreáticos cuando se administra en dosis fisiológicas. El GIP se cree que funciona como un factor entérico que estimula la liberación de insulina pancreática y que pueden desempeñar un papel fisiológico en el mantenimiento de la homeostasis de la glucosa.

[0007] La osteocalcina es una proteína no colágena que se halla en el hueso y la dentina. Es secretada por los osteoblastos y se cree que desempeña un papel en la mineralización y la homeostasis de iones de calcio. Se ha descrito que la osteocalcina también funciona como una hormona en el cuerpo, haciendo que las células beta en el páncreas liberen más insulina, y al mismo tiempo dirijan las células de grasa para liberar la hormona adiponectina, que aumenta la sensibilidad a la insulina.

60 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

[0008] En el presente documento se proporcionan péptidos de la superfamilia del glucagón conjugados con ligandos que activan receptores de glucocorticoides nucleares (ligandos "GR"). Estos conjugados con actividades plurales son útiles para el tratamiento de una variedad de enfermedades.

[0009] Los conjugados de péptidos de la superfamilia de glucagón de la invención pueden representarse por la siguiente fórmula:

5 **Q-L-Y**

en los que **Q** es un péptido de la superfamilia del glucagón, **Y** es un ligando de GR, y **L** es un grupo enlazador o un enlace. Por ejemplo, el ligando de GR se conjuga con Q o L en la posición 3 o 17 del ligando de GR. En particular, la presente invención se refiere al compuesto que comprende la estructura **Q-L-Y** como se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el compuesto como se define en las reivindicaciones y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente invención se refiere además a una composición farmacéutica, tal como se define en las reivindicaciones, para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección médica en un paciente, en el que la enfermedad o afección médica se selecciona del grupo que consiste en síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática, y una enfermedad neurodegenerativa.

[0010] El péptido de la superfamilia de glucagón (Q) en algunas realizaciones puede ser un péptido relacionado con glucagón que presenta actividad agonista en el receptor de glucagón, actividad agonista en el receptor de GLP-1, actividad agonista en el receptor de GIP, coagonista de la actividad en los receptores de glucagón y GLP-1, la actividad co-agonista en los receptores de glucagón y GIP, co-agonista de la actividad en los receptores de GIP y GLP-1, o actividad tri-agonista en los receptores de glucagón, GIP y GLP-1. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón muestra actividad antagonista en los receptores de glucagón, GLP-1 o GIP. La actividad del péptido relacionado con glucagón en el receptor de glucagón, en el receptor de GLP-1, o en el receptor de GIP pueden estar según cualquiera de las enseñanzas establecidas en el presente documento. En algunas realizaciones específicas, el péptido relacionado con el glucagón muestra al menos 0,1% de actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, al menos 0,1% de actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, o al menos 0,1% de actividad de GIP natural en el receptor de GIP.

[0011] El ligando de GR (**Y**) es total o parcialmente no peptídico y actúa en un receptor de glucocorticoides con una actividad según cualquiera de las enseñanzas establecidas en el presente documento. En algunas realizaciones, el ligando de GR tiene una EC₅₀ o IC₅₀ de aproximadamente 1 mM o menos, o 100 μM o menos, o 10 μM o menos, o 1 μM o menos. En algunas realizaciones, el ligando de GR tiene un peso molecular de hasta aproximadamente 5000 daltons, o hasta aproximadamente 2000 daltons, o hasta aproximadamente 1000 daltons, o hasta aproximadamente 500 daltons. El ligando de GR puede actuar en cualquiera de los receptores de glucocorticoides descritos en el presente documento o tener cualquiera de las estructuras descritas en el presente documento.

[0012] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón tiene una EC₅₀ (o IC₅₀) en el receptor de glucagón en aproximadamente 2000 veces, 1000 veces, 100 veces, o en aproximadamente 75 veces, o en aproximadamente 50 veces, o en aproximadamente 40, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 veces de la EC₅₀ o IC₅₀ del ligando de GR en su receptor de glucocorticoides. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón tiene una EC₅₀ (o IC₅₀) en el receptor de GLP-1 en aproximadamente 2000 veces, 1000 veces, 100 veces, o en aproximadamente 75 veces, o en aproximadamente 50 veces, o en aproximadamente 40, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 veces de la EC₅₀ o IC₅₀ del ligando de GR en su receptor de glucocorticoides. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón tiene una EC₅₀ (o IC₅₀) en el receptor de GIP en aproximadamente 2000 veces, 1000 veces, 100 veces, o en aproximadamente 75 veces, o en aproximadamente 50 veces, o en aproximadamente 40, 30, 25, 20, 15, 10 o 5 veces de la EC₅₀ o IC₅₀ del ligando de GR en su receptor de glucocorticoides.

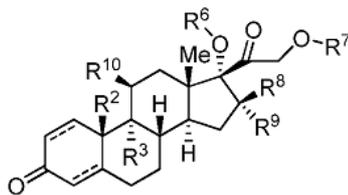
[0013] En algunos aspectos de la descripción, se proporcionan profármacos de **Q-L-Y** en los que el profármaco comprende un elemento de dipéptido profármaco (A-B) unido covalentemente a un sitio activo de **Q** a través de un enlace amida. La posterior eliminación del dipéptido en condiciones fisiológicas y en ausencia de la actividad enzimática restaura la actividad completa al conjugado **Q-L-Y**.

[0014] En algunos aspectos de la invención, también se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden el conjugado **Q-L-Y** y un portador farmacéuticamente aceptable.

[0015] En otros aspectos de la descripción, se proporcionan procedimientos para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado **Q-L-Y** descrito en el presente documento para el tratamiento de una enfermedad o afección médica en un paciente. En algunas realizaciones, la enfermedad o afección médica se selecciona del grupo que consiste en síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa.

[0016] Los ligandos GR incluyen cortisol y derivados del mismo, y se refiere a compuestos, ya sean de origen natural o sintetizados, de fórmula C:

65



Fórmula C

en la que R², R³, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, y R¹⁰ son cada uno independientemente restos que permiten o promueven la actividad agonista o antagonista de la unión del compuesto de fórmula C a un receptor de hormona nuclear o receptor de glucocorticoides; y cada guión respresents un doble enlace opcional. En algunas realizaciones, la estructura de la Fórmula C está sustituida con uno o más sustituyentes en una o más posiciones del anillo tetracíclico, tales como, por ejemplo, las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, y 15. Ejemplos no limitativos específicos de derivados de cortisol y derivados de los mismos incluyen cortisol, acetato de cortisona, beclometasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona, trimcinolona y dexametasona.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0017]

La figura 1 presenta una alineación de las secuencias de aminoácidos de diversos péptidos de la superfamilia del glucagón o fragmentos relevantes de las mismas. Las secuencias de aminoácidos presentadas son GHRH (SEQ ID NO: 1619), PHI (SEQ ID NO: 1622), VIP (SEQ ID NO: 1620), PACAP-27 (SEQ ID NO: 1621), exendina-4 (SEQ ID NO: 1618), GLP-1 (SEQ ID NO: 1603), glucagón (SEQ ID NO: 1601), oxintomodulina (SEQ ID NO: 1606), GIP (SEQ ID NO: 1607), GLP-2 (SEQ ID NO: 1608) y secretina (SEQ ID NO: 1624). La alineación muestra cómo las posiciones de aminoácidos del glucagón pueden corresponder a las posiciones de aminoácidos en otros péptidos de la superfamilia de glucagón.

La figura 2 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados sobre el cambio en los niveles de peso corporal y glucosa en sangre en ratones db/db. La figura 2a ilustra que los ratones a los que se les administró una dosis alta de conjugado de GLP-1(Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentaron una disminución ligeramente mayor en el peso corporal que en ratones que fueron administrados con GLP-1 solo, pero similar al vehículo. Las Figuras 2b y 2c muestran ratones a los que se les administró una dosis alta de conjugado de GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) que experimentaron una mayor disminución de los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 14, lo que demuestra que la mayor capacidad para mejorar la independencia de la glucosa de un cambio en el peso corporal.

La figura 3 ilustra el efecto de administración de los conjugados de GLP-1 indicados en la glucosa en sangre, el peso corporal, la masa grasa y la masa muscular magra en ratones obesos inducidos por la dieta. La figura 3a ilustra los resultados de un ensayo IPGTT en el día 21. Las figuras 3b-d ilustran el efecto de administración de los conjugados de GLP-1 indicados sobre el cambio en el peso corporal (Figura 3b), el cambio en la masa grasa (Figura 3c), y el cambio en la masa muscular magra (Figura 3d) en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentaron una mayor disminución en el peso corporal, y la masa grasa, y el menor cambio de la masa muscular magra. La figura 3e ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en los cambios en la glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró una dosis alta de conjugado de GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentaron una mayor disminución en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 14. Estos resultados demuestran la eficacia dependiente de la dosis añadida de la adición de estrógeno a un agonista de GLP-1 basado en A22 débil.

La figura 4 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en los niveles de glucosa en la sangre, el cambio en el peso corporal, el cambio en la masa grasa, y el cambio de la glucosa en sangre. La figura 4a ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en una prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en los niveles de glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta después de catorce dosis diarias. Las Figuras 4b-c ilustran el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal y el cambio en la masa grasa en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró una dosis alta de conjugados de GLP-1/estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total (Figura 4b). La masa grasa se redujo en la dosis alta de conjugado de éter de estrógeno con respecto a los animales tratados con vehículo (Figura 4C). La figura 4d ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en los cambios en la glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta. En la dosis alta, los ratones a los que se les administró conjugado de GLP-1 (Aib²E¹⁶CexK⁴⁰)/estrógeno experimentaron un mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 21 que los ratones a los que se les administró GLP-1 (Aib²E¹⁶CexK⁴⁰) solo.

La figura 5 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados sobre el cambio en el peso corporal y el cambio de la glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró una dosis alta de conjugados de GLP-1/estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal (Figura 5a). Los ratones a los que se les administró dosis altas o bajas de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) experimentaron el mayor cambio en la glucosa en sangre, junto con la de la dosis alta de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter) (figura 5B).

La figura 6 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal, la masa grasa, y los cambios en la glucosa en sangre en los ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró conjugado de estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total (Figura 6a). El análisis de la masa grasa (Figura 6b) fue relativamente constante con pérdida total de peso corporal. Los ratones a los que se les administra un conjugado de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter) o GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (17-éter) experimentaron el mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 7 (Figura 6c).

La figura 7 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal y glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró conjugados de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total (figura 7a) y los niveles de glucosa en sangre (Figura 7b) durante un período de 7 días. Ni los péptidos que contienen A22 ni los péptidos que contienen d-aminoácidos demostraron mucha disminución en relación con los conjugados GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno. Adicionalmente, los coniuagates de estrógeno de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) eran claramente más eficaces que la forma no estrógeno del mismo péptido.

La figura 8 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados sobre el cambio en el peso corporal, glucosa en la sangre, y la masa grasa. Los péptidos que contenían d-aminoácidos eran claramente inferiores en todas las medidas de eficacia con respecto a los péptidos que contenían 1-aminoácido. La figura 8a ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio de peso corporal en ratones obesos inducidos por la dieta. Hubo poca diferencia aparente en la disminución de peso corporal a estas dosis para los péptidos con y sin el estrógeno. No obstante, en la Figura 8b se muestra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio de la glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administra el conjugado de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) experimentaron el mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 7 *in vivo*, mucho más que los animales tratados con el mismo péptido, pero sin estrógeno. Esto demostró la mejora directa de la independencia de glucosa en sangre de una diferencia en el peso corporal. La figura 8c ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados sobre el cambio en la masa grasa.

La figura 9 ilustra el efecto de la administración de los GLP-1 conjugados indicados en el cambio en el peso corporal, la cantidad de masa grasa, y el cambio de la glucosa en sangre en ratones obesos inducida por la dieta. Los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éster) que contiene el d-aminoácido a dosis elevadas en relación con el aminoácido que contiene el control 1 experimentaron la mayor disminución en el peso corporal (Figura 9a) y tenían la menor cantidad de masa grasa (Figura 9b). Hubo una clara disminución de la dependencia de la glucosa con la dosis en el conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éster) que contiene el d-aminoácido entre los días 0 y 7 y aumentó en la dosis más alta con respecto a los ratones a los que se les administró GLP-1 solo (Figura 9c).

La figura 10 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal y cambios en los niveles de glucosa en sangre en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP-1/estrógeno que contiene el aminoácido d donde el estrógeno estaba unido covalentemente, ya sea como una amida estable o éster que era inestable *in vivo*. Los animales tratados con el conjugado de éster inestable experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total (Figura 10a). La figura 10b ilustra que los ratones administrados el conjugado de GLP-1/éster de estrógeno experimentaron un mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 7 que los ratones a los que se les administró un péptido que contiene d-aminoácido comparable, pero con un conjugado de estrógeno estable.

La figura 11 ilustra la actividad de los conjugados indicados en el receptor de GLP-1 y el receptor de estrógeno. Los conjugados de GLP-1/estrógeno metaestables activos fueron igualmente activos en el receptor de GLP-1 (Figura 11a), y tenía actividad variable en el receptor de estrógeno (Figura 11b).

La figura 12 ilustra el efecto de la administración de los conjugados GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal, la ingesta de alimentos, la glucosa en sangre, el peso del hígado, y peso del útero en ratones obesos inducidos por la dieta. Los ratones a los que se les administró un conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éster) que contiene d-ámioácido lábil de estrógeno inactivo experimentaron la mayor disminución en el peso corporal, con el efecto más pronunciado a una dosis alta (Figura 12a). La figura 12b ilustra que los ratones a los que se les administró el conjugado conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éster) que contiene d-ámioácido lábil de estrógeno inactivo consumieron significativamente menos comida que los ratones a los que se les administró GLP-1 solo que

5 contenía d-aminoácido inactivo o un conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo, con el efecto más pronunciado a una dosis alta. La figura 12c muestra que una alta dosis del conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo disminuye los niveles de glucosa en sangre en relación con animales tratados con vehículo. La figura 12d muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo experimentaron una sutil pero mayor disminución en el peso del hígado que los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido inactivo con estrógeno estable. La figura 12e muestra que los ratones a los que se les administró conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo experimentaron un aumento significativamente mayor en peso del útero de ratones que los ratones a los que les administró GLP-1 solo inactivo o el conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido inactivo estable de estrógeno.

15 La figura 13 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal, la masa grasa, la ingesta de alimentos, los niveles de glucosa en sangre, y el peso del útero de ratas ovariectomizadas. La figura 13a muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) de estrógeno estable activo experimentaron una mayor disminución en el peso corporal que los ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1 solo activo, el conjugado de GLP-1/estróna (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo o el conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido de estrógeno estable inactivo. La figura 13b muestra que los ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1, el conjugado de GLP-1/estróna (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo y el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) de estrógeno estable activo mostraron una disminución de la masa grasa. La figura 13C muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP 1/estrógeno (3-éter) estable de estrógeno activo consumieron menos comida que los ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1 solo activo, el conjugado de GLP-1/estróna (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo o el conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido de estrógeno estable inactivo. La figura 13d muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP -1/estróna (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo, o conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno estable inactivo o el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) de estrógeno estable activo experimentaron una disminución en los niveles de glucosa en sangre mayores que el vehículo, y que los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido de estrógeno estable inactivo no mostró una disminución en los niveles de glucosa en sangre. La figura 13e muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP 1/estróna (3-éster) que contiene d-aminoácido lábil de estrógeno inactivo experimentaron un aumento significativamente mayor en peso del útero que ratones a los que se les administró GLP-1 solo, el conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) que contiene d-aminoácido de estrógeno estable inactivo o el conjugado de GLP 1/estrógeno (3-éter) de estrógeno estable activo.

40 La figura 14 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal, la masa grasa, la glucosa en sangre, y el peso del útero de ratas ovariectomizadas. Los ratones a los que se les administró los conjugados de agonista de GLP-1/estrógeno metaestables experimentaron una mayor disminución en el peso corporal y la masa grasa que los ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1 solo activo o el conjugado de agonista de GLP-1/estróna (3-éster) lábil de estrógeno activo (figuras 14a y 14b). Los ratones a los que se les administró los conjugados de enzima metaestable y lábil de ácido, agonista de GLP-1/estrógeno (17-catepsina) y agonista de GLP-1/estrógeno (17-hidrazona), respectivamente, inicialmente tenían la mayor disminución en el peso corporal, mientras el conjugado lábil de reducción de tiol metaestable, agonista de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro), exhibió la mayor disminución global en el peso corporal. La figura 14C muestra que los ratones a los que se les administró los conjugados de reducción de tiol metaestable y lábil de ácido, agonista de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro) y agonista de GLP-1/estrógeno (17-hidrazona), respectivamente, experimentaron una mayor disminución de los niveles de glucosa en sangre que el conjugado de agonista de GLP-1/estróna (3-éster). La figura 14d muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de GLP-1/estróna (3-éster) lábil de estrógeno experimentaron un aumento significativamente mayor en peso del útero que ratones a los que se les administró cualquiera de los tres conjugados de GLP-1/estrógeno metaestables.

55 La figura 15 ilustra el efecto de la administración de los conjugados de GLP-1 indicados en el cambio en el peso corporal y la ingesta de alimentos acumulativa. Los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) estable de estrógeno activo experimentó una disminución significativamente mayor en el peso corporal que ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1 activo solo o el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) lábil de estrógeno activo (Figura 15a). La figura 15b muestra que los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) estable de estrógeno activo consumieron significativamente menos comida que los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) lábil de estrógeno activo

60 Las Figuras 16a-e ilustran perfiles de HPLC que ilustran la estabilidad de los conjugados de GLP-1/estrógeno indicados en plasma humano a 37°C. Los conjugados de GLP-1/estrógeno (3-éter) de estrógeno estable no mostraron liberación de estrógeno durante 72 horas, mientras que los conjugados de GLP-1/estrógeno (3-éster) lábil de estrógeno mostraron una liberación de estrógeno sustancial después de 3 horas y la liberación de estrógeno completa en 6 horas.

Las Figuras 17a-c ilustran el efecto de la administración de los conjugados indicados en el cambio en porcentaje de peso corporal, la ingesta de alimentos acumulativa, y los niveles de glucosa en sangre de ratones con obesidad inducida por dieta.

5 Las Figuras 18a-c ilustran el efecto de la administración de los conjugados indicados en el cambio en porcentaje de peso corporal, la ingesta de alimentos acumulativa, y los niveles de glucosa en sangre en ratones de tipo natural con obesidad inducida por la dieta, ratones sin el receptor beta de estrógeno (ER β KO), y ratones sin el receptor alfa de estrógeno (ER α KO).

10 La figura 19 ilustra el efecto de los conjugados de GLP-1 indicados en los niveles de glucosa en sangre con el tiempo. Los ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1 mostró la disminución menos eficaz de glucosa en sangre durante 48 horas (excepto para el vehículo), mientras que los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) de estrógenos estable mostraron la disminución más eficaz de la glucosa en sangre durante 48 horas.

15 La figura 20 ilustra un esquema de síntesis para generar un conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona con un enlazador carbamato β -alanina.

20 La figura 21 ilustra el conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona sintetizado según el esquema ilustrado en la figura 20.

La figura 22 ilustra un esquema de síntesis para generar un conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona a través de la conjugación de hidrazina.

25 La figura 23 ilustra el conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona sintetizado según el esquema ilustrado en la figura 22.

30 La figura 24 ilustra el efecto de los conjugados de GLP-1 indicados en la inducción de luciferasa mediada por el receptor de glucocorticoides.

La figura 25 ilustra ensayos de actividad de receptores de GLP-1 (Figura 25a) y de glucocorticoides (Figura 25b) usando los conjugados de GLP-1 indicados.

35 La Figura 26 ilustra ensayos de actividad de receptores de GLP-1 (Figura 25a) y de glucocorticoides (Figura 25b) usando los conjugados de GLP-1 indicados.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

40 **[0018]** La presente invención se refiere a un compuesto que comprende la estructura **Q-L-Y**, tal como se define en las reivindicaciones. La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende el compuesto, tal como se define en las reivindicaciones y un portador farmacéuticamente aceptable. La presente invención se refiere además a la composición farmacéutica, tal como se define en las reivindicaciones, para utilizar en el tratamiento de una enfermedad o afección médica en un paciente, donde la enfermedad o afección médica se selecciona del grupo que consiste en síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa.

DEFINICIONES

50 **[0019]** Al describir y reivindicar la invención, se utilizará la siguiente terminología según las definiciones establecidas a continuación.

55 **[0020]** El término "aproximadamente", tal como se utiliza en el presente documento, significa mayor o menor que el valor o intervalo de valores indicados en un 10 por ciento, pero no pretende designar cualquier valor o intervalo de valores a sólo a esta definición más amplia. Cada valor o intervalo de valores precedidos por el término "aproximadamente" también pretende abarcar la realización del valor absoluto o intervalo de valores indicados.

60 **[0021]** Tal como se utiliza en el presente 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 una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. El término también abarca cualquiera de los agentes aprobados por una agencia reguladora del gobierno federal de los EE.UU. o listados en la Farmacopea de los EE.UU. para su uso en animales, incluyendo seres humanos.

65 **[0022]** 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 precursor, y que no son biológicamente o de otra

manera indeseables. Muchos de los compuestos descritos en el presente documento son capaces de formar sales ácidas y/o básicas debido a la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

5 **[0023]** 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, a modo de ejemplo solamente, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias. Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. Las sales derivadas de ácidos orgánicos
10 incluyen ácido acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido plúvico, 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-tolueno-sulfónico, ácido salicílico, y similares.

15 **[0024]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento" incluye la profilaxis del trastorno o afección específica, o alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específica y/o prevención o eliminación de dichos síntomas. Por ejemplo, tal como se utiliza en el presente documento, el término "tratamiento de la diabetes" se referirá en general a la alteración de los niveles de glucosa en sangre en la dirección de los niveles normales y puede incluir aumentar o disminuir los niveles de glucosa en sangre dependiendo de una situación determinada.

20 **[0025]** Tal como se utiliza en el presente documento, una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido de glucagón se refiere a una cantidad no tóxica pero suficiente del péptido para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, un efecto deseado sería la prevención o el tratamiento de la hipoglucemia, tal como se mide, por ejemplo, por un aumento en el nivel de glucosa en sangre. Un efecto deseado alternativa para los péptidos de glucagón de la presente descripción incluiría el tratamiento de la hiperglucemia, por ejemplo, medida por un cambio en el nivel de glucosa en sangre cerca de lo normal, o la inducción de la pérdida de peso/prevención del aumento de peso, por ejemplo, medidos por la reducción en el peso corporal o prevenir o reducir un aumento en el peso corporal, o normalización de la distribución de grasa corporal. La cantidad que es "eficaz" variará de un sujeto a otro, dependiendo de la edad y el estado general de la persona, el modo de administración, y similares. Por lo tanto, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual puede ser determinada por un experto normal en la técnica usando experimentación de rutina.

35 **[0026]** El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra ruta, tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa.

40 **[0027]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "paciente" sin más designación pretende abarcar cualquier animal domesticado vertebrado de sangre caliente (incluyendo por ejemplo animales de granja, caballos, gatos, perros y otros animales), mamíferos y seres humanos.

45 **[0028]** El término "aislado", como se usa en el presente documento, significa haber sido extraído de su entorno natural. En algunas realizaciones, el análogo se reproduce a través de procedimientos recombinantes y el análogo se aísla de la célula huésped.

50 **[0029]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" y términos similares se refieren 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 medio natural o natural. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "purificado" no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa. El término "polipéptido purificado" se utiliza en el presente documento para describir un polipéptido que se ha separado de otros compuestos incluyendo moléculas de ácidos nucleicos, lípidos e hidratos de carbono.

55 **[0030]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido" abarca una secuencia de 2 o más aminoácidos y típicamente menos de 50 aminoácidos, en el que los aminoácidos son naturales o codificados de forma natural o aminoácidos de origen no natural o no codificados de forma natural. Los aminoácidos de origen no natural se refieren a aminoácidos que son naturales *in vivo*, pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas en el presente documento. "No codificado" como se usa en el presente documento se refieren a un 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.

60 **[0031]** Tal como se usa en el presente documento, "parcialmente no peptídico" se refiere a una molécula de la que una parte de la molécula es un compuesto químico o sustituyente que tiene actividad biológica y que no comprende una secuencia de aminoácidos.

65 **[0032]** Tal como se usa en el presente documento, "no peptídico" se refiere a una molécula que tiene actividad biológica y que no comprende una secuencia de aminoácidos.

[0033] Tal como se usa en el presente documento, los términos "polipéptido" y "proteína" son términos que se utilizan indistintamente para referirse a un polímero de aminoácidos, sin tener en cuenta la longitud del polímero. Típicamente, los polipéptidos y las proteínas tienen una longitud de polímero que es mayor que la de "péptidos". En algunos casos, una proteína comprende más de una cadena polipeptídica unidas covalentemente o no covalentemente entre sí.

[0034] En toda la solicitud, todas las referencias a una posición de aminoácido particular por número (por ejemplo, la posición 28) se refieren al aminoácido en esa posición en el glucagón natural (SEQ ID NO: 1601) o la posición de aminoácido correspondiente en cualquiera de los análogos del mismo. Por ejemplo, una referencia en el presente documento a la "posición 28" significaría la posición correspondiente 27 para un análogo de glucagón en la que el primer aminoácido de la SEQ ID NO: 1601 ha sido eliminada. Del mismo modo, una referencia en el presente documento a "posición 28" significaría la posición correspondiente 29 para un análogo de glucagón en la que un aminoácido se ha añadido antes del extremo N-terminal de SEQ ID NO: 1601.

[0035] Tal como se usa en el presente documento una "modificación de aminoácido" se refiere a (i) una sustitución o el reemplazo de un aminoácido del péptido de referencia (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1601, 1603, 1607) por un aminoácido diferente (aminoácido de origen natural o codificado o no codificado o no de origen natural), (ii) una adición de un aminoácido (aminoácido de origen natural o codificado o no codificado o no de origen natural) al péptido de referencia (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1601, 1603, 1607) o (iii) una delección de uno o más aminoácidos del péptido de referencia (por ejemplo, SEQ ID NOs: 1601, 1603, 1607).

[0036] En algunas realizaciones, la sustitución o reemplazo de aminoácido es una sustitución conservativa de aminoácido, por ejemplo, una sustitución conservativa del aminoácido en una o más de las posiciones 1, 2, 5, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sustitución conservativa de aminoácido" es la sustitución de un aminoácido por otro aminoácido que tiene similares propiedades, por ejemplo, tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o aromaticidad, e incluye los intercambios dentro de uno de los cinco grupos siguientes:

I. Residuos pequeños alifáticos, no polares o ligeramente polares:

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares, cargados negativamente y sus amidas y ésteres:

Asp, Asn, Glu, Gln, ácido cisteico y ácido homocisteico;

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 grandes aromáticos:

Phe, Tyr, Trp, acetil fenilalanina

[0037] En algunas realizaciones, la sustitución de aminoácido no es una sustitución conservativa de aminoácidos, por ejemplo, es una sustitución de aminoácido no conservativa.

[0038] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido" incluye cualquier molécula que contiene grupos funcionales amino y carboxilo, en el que los grupos amino y carboxilo están unidos al mismo carbono (el carbono alfa). El carbono alfa opcionalmente puede tener uno o dos sustituyentes orgánicos adicionales. A los efectos de la presente descripción, la designación de un aminoácido sin especificar su estereoquímica pretende abarcar tanto la forma **L** como **D** del aminoácido, o una mezcla racémica. Sin embargo, en el caso en que un aminoácido sea designado por su código de tres letras e incluye un número superíndice (es decir, Lys⁻¹), dicha designación pretende especificar la forma **L** natural del aminoácido, mientras que la forma **D** se especifica mediante la inclusión de una letra minúscula **d** antes del código de tres letras y el número superíndice (es decir, dLys⁻¹).

[0039] Tal como se usa en el presente documento, el término "hidroxil ácido" se refiere a un aminoácido que ha sido modificado para reemplazar el grupo amino en carbono alfa por un grupo hidroxilo.

[0040] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido cargado" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que tiene una carga negativa (es decir, desprotonado) o carga positiva (es decir, protonado) en solución acuosa a pH fisiológico. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico, y ácido homoglutámico, mientras que los aminoácidos de carga positiva incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos cargados incluyen los aminoácidos cargados entre los 20 aminoácidos codificados, así como aminoácidos atípicos o de origen no natural o no codificados.

[0041] 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 ácido carboxílico de cadena lateral.

- 5 **[0042]** Tal como se usa en el presente documento un aminoácido "acilado" es un aminoácido que comprende un grupo acilo que es no natural a un aminoácido de origen natural, sin tener en cuenta por los medios por los que se produce. Ejemplos de procedimientos para la producción de aminoácidos acilados y péptidos acilados son conocidos en la técnica e incluyen la acilación de un aminoácido antes de la inclusión en el péptido o la síntesis de péptidos seguido de acilación química del péptido. En algunas realizaciones, el grupo acilo hace que el péptido tenga una o más de (i) una semivida prolongada en la circulación, (ii) un retraso en la aparición de la acción, (iii) una duración prolongada de acción, (iv) una mejor resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV, y (v) aumento de la potencia en el receptor de péptido de la superfamilia de glucagón.
- 10 **[0043]** Tal como se usa en el presente documento, un aminoácido "alquilado" es un aminoácido que comprende un grupo alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural, independientemente de los medios por los que se produce. Ejemplos de procedimientos para la producción de aminoácidos alquilados y péptidos alquilados se conocen en la técnica y que incluyen la alquilación de un aminoácido antes de la inclusión en el péptido o síntesis de péptido seguido de alquilación química del péptido. Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que la alquilación de péptidos logrará efectos similares, si no los mismos, que la acilación de los péptidos, por ejemplo, una semivida prolongada en la circulación, un retraso en la aparición de la acción, una duración prolongada de acción, una resistencia mejorada a las proteasas, tales como DPP-IV, y el aumento de la potencia en el receptor de péptido de superfamilia de glucagón.
- 15 **[0044]** El término "alquilo C₁-C_n" en el que n puede ser de 1 a 18, tal como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene de uno al número especificado de átomos de carbono. Por ejemplo, alquilo C₁-C₆ representa un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene de 1 a 6 átomos de carbono. Los grupos alquilo C₁-C₁₈ típicos incluyen metilo, etilo, n-propilo, isopropilo, butilo, iso-butilo, sec-butilo, terc-butilo, pentilo, hexilo y similares. Los grupos alquilo pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con hidroxilo (OH), halo, arilo, carboxilo, tio, cicloalquilo C₃-C₈ y amino.
- 20 **[0045]** El término "alquilo C₀-C_n" en el que n puede ser de 1-18, tal como se usa en el presente documento, representa un grupo alquilo ramificado o lineal que tiene hasta 18 átomos de carbono. Por ejemplo, el término "(alquilo C₀-C₆)OH" representa un resto precursor hidroxilo unido a un sustituyente alquilo que tiene hasta 6 átomos de carbono (por ejemplo, -OH, -CH₂OH, -C₂H₄OH, -C₃H₆OH, -C₄H₈OH, -C₅H₁₀OH, -C₆H₁₂OH).
- 25 **[0046]** El término "alqueno C₂-C_n" en el que n puede ser de 2 a 18, tal como se usa en el presente documento, representa un grupo ramificado o lineal insaturado que tiene de 2 al número especificado de átomos de carbono y al menos un doble enlace. Ejemplos de tales grupos incluyen 1-propenilo, 2-propenilo (CH₂-CH=CH₂), 1,3-butadienilo, (-CH=CHCH=CH₂), 1-butenilo (-CH=CHCH₂CH₃), hexenilo, pentenilo, y similares. Los grupos alqueno pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con hidroxilo (OH), halo, arilo, carboxilo, tio, cicloalquilo C₃-C₈ y amino.
- 30 **[0047]** El término "alquino C₂-C_n" en el que n puede ser de 2 a 18, se refiere a un grupo ramificado o lineal insaturado que tiene de 2 a n átomos de carbono y al menos un triple enlace. Ejemplos de tales grupos incluyen 1-propinilo, 2-propinilo, 1-butinilo, 2-butinilo, 1-pentinilo, y similares. Los grupos alquino pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con hidroxilo (OH), halo, arilo, carboxilo, tio, cicloalquilo C₃-C₈, y amino.
- 35 **[0048]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "arilo" se refiere a grupos aromáticos monocíclicos o policíclicos (por ejemplo, bicíclico, tricíclico, o tetracíclico). El tamaño del anillo o anillos de arilo se indica mediante la designación del número de átomos de carbono presentes. Por ejemplo, el término "(alquilo C₁-C₃)(arilo C₆-C₁₀)" se refiere a un arilo de 6 a 10 miembros que está unido a un resto precursor a través de una cadena de alquilo de uno a tres miembros. A menos que se indique lo contrario, un grupo arilo puede estar no sustituido o sustituido con uno o más, y en particular uno a cinco grupos seleccionados independientemente de, por ejemplo, halo, alquilo, alqueno, OCF₃, NO₂, CN, NC, OH, alcoxi, amino, CO₂H, cicloalquilo C₃-C₈, C(O)Oalquilo, arilo, y heteroarilo. Los grupos arilo de ejemplo incluyen fenilo, naftilo, tetrahidronaftilo, clorofenilo, indanilo, indenilo, metilfenilo, metoxifenilo, trifluorometilfenilo, nitrofenilo, 2,4-metoxiclorofenilo, y similares.
- 40 **[0049]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroarilo" se refiere a un sistema anular monocíclico o policíclico que contiene uno o más anillos aromáticos y que contiene al menos un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre en un anillo aromático. El tamaño del anillo de heteroarilo y la presencia de sustituyentes o grupos de unión se indican mediante la designación del número de átomos de carbono presentes. Por ejemplo, el término "(alquilo C₁-C₆)(heteroarilo C₅-C₆)" se refiere a un heteroarilo de 5 o 6 miembros que está unido a un resto precursor a través de una cadena de alquilo de uno a 6 miembros. A menos que se indique lo contrario, un grupo heteroarilo puede estar no sustituido o sustituido con uno o más, y en particular uno a cinco grupos seleccionados independientemente de, por ejemplo, halo, alquilo, alqueno, OCF₃, NO₂, CN, NC, OH, alcoxi, amino, CO₂H, cicloalquilo C₃-C₈, C(O)Oalquilo, arilo, y heteroarilo. Los ejemplos de grupos heteroarilo incluyen tienilo, furilo, piridilo, oxazolilo, quinolilo, tiofenilo, isoquinolilo, indolilo, triazinilo, triazolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, imidazolilo, benzotiazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, tiazolilo y tiadiazolilo.
- 45 **[0050]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "heteroalquilo" se refiere a un hidrocarburo lineal o ramificado que contiene el número indicado de átomos de carbono y al menos un heteroátomo en el esqueleto de la
- 50
- 55
- 60
- 65

estructura. Los heteroátomos adecuados para propósitos de la presente invención incluyen N, S, y O. Los grupos heteroalquilo pueden estar opcionalmente sustituidos, por ejemplo, con hidroxilo (OH), halo, arilo, carboxilo, y amino.

5 **[0051]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "halógeno" o "halo" se refiere a uno o más miembros del grupo que consiste en flúor, cloro, bromo, y yodo.

10 **[0052]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido relacionado con glucagón" se refiere a aquellos péptidos que tienen actividad biológica (como agonistas o antagonistas) en uno cualquiera o más de los receptores de glucagón, GLP-1, GLP-2, y GIP y comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos una identidad de secuencia del 40% (por ejemplo, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) con al menos uno de glucagón natural, oxintomodulina natural, exendina-4 natural, GLP-1 natural, GLP-2 natural, o GIP natural. A menos que se indique lo contrario, cualquier referencia a una posición de aminoácido en un péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, para la unión de un ligando de NHR, un resto de conjugado, un polímero hidrófilo, acilación o alquilación) se refiere a la posición correspondiente con respecto a la secuencia de aminoácidos del glucagón natural (SEQ ID NO: 1601).

15 **[0053]** 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: EC_{50} de la molécula en el segundo receptor dividido por la EC_{50} de la molécula en el primer receptor. Por ejemplo, una molécula que tiene una EC_{50} de 1 nM en un primer receptor y una EC_{50} de 100 nM en un segundo receptor tiene una selectividad de 100 veces para el primer receptor en relación con el segundo receptor.

20 **[0054]** 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 conseguir un porcentaje. De este modo, dos copias de exactamente la misma secuencia tienen una identidad del 100%, mientras que dos secuencias que tienen delecciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos de uno respecto al otro tienen un menor grado de identidad. Los expertos en la técnica reconocerán que varios programas de ordenador, tales como los que emplean algoritmos tales 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.

25 **[0055]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "péptido de la superfamilia de glucagón" se refiere a un grupo de péptidos relacionados en la estructura en sus regiones N-terminal y C-terminal (véase, por ejemplo, Sherwood et al, Endocrine Reviews 21: 619- 670 (2000)). Los miembros de este grupo incluyen todos los péptidos relacionados con glucagón, así como la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH; SEQ ID NO: 1619), péptido intestinal vasoactivo (VIP; SEQ ID NO: 1620), polipéptido 27 activador de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP-27; SEQ ID NO: 1621), el péptido histidina isoleucina (PHI; SEQ ID NO: 1642), péptido histidina metionina (PHM; SEQ ID NO: 1622), secretina (SEQ ID NO: 1623), y análogos, derivados o conjugados con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos con relación al péptido natural. Tales péptidos conservan preferentemente la capacidad de interactuar (agonista o antagonista) con los receptores de la superfamilia de receptores de glucagón. A menos que se indique lo contrario, cualquier referencia a una posición de aminoácido en un péptido de la superfamilia de glucagón (por ejemplo, para la unión de un ligando de NHR, un resto de conjugado, un polímero hidrófilo, acilación o alquilación) se refiere a la posición correspondiente con respecto a la secuencia de aminoácidos del glucagón natural (SEQ ID NO: 1601), ver la figura 1 para una alineación de péptidos de la superfamilia de glucagón representativos.

30 **[0056]** El término "péptido agonista de glucagón" se refiere a un compuesto que se une y activa la señalización aguas abajo del receptor de glucagón. Sin embargo, este término no debe interpretarse como una limitación del compuesto de tener actividad en sólo el receptor de glucagón. Más bien, los péptidos agonistas de glucagón de la presente divulgación pueden mostrar actividades adicionales en otros receptores, tal como se analiza adicionalmente en el presente documento. Los péptidos agonistas de glucagón, por ejemplo, pueden mostrar actividad (por ejemplo, la actividad agonista) en el receptor de GLP-1 y/o el receptor de GIP. También, el término "péptido agonista de glucagón" no debe interpretarse como una limitación del compuesto a sólo los péptidos. Más bien, los compuestos distintos de los péptidos están abarcados por este término. En consecuencia, el péptido agonista de glucagón en algunos aspectos es un péptido en forma de conjugado (un heterodímero, un multímero, un péptido de fusión), un péptido derivatizado químicamente, una sal farmacéutica de un péptido, un peptidomimético, y similares.

35 **[0057]** El término "péptido agonista de GLP-1" se refiere a un compuesto que se une y activa la señalización aguas abajo del receptor de GLP-1. Sin embargo, este término no debe interpretarse como una limitación del compuesto de tener actividad en sólo el receptor de GLP-1. Más bien, los péptidos agonistas de GLP-1 de la presente divulgación pueden mostrar actividades adicionales en otros receptores, tal como se analiza adicionalmente en el presente documento. Los péptidos agonistas de GLP-1, por ejemplo, pueden mostrar actividad (por ejemplo, actividad agonista) en el receptor de glucagón y/o el receptor de GIP. También, el término "péptido agonista de GLP-1" no debe interpretarse como una limitación del compuesto a sólo los péptidos. Más bien, los compuestos distintos de los péptidos están abarcados por este término. En consecuencia, el péptido agonista de GLP-1 en algunos aspectos es

un péptido en forma de conjugado (un heterodímero, un multímero, un péptido de fusión), un péptido derivatizado químicamente, una sal farmacéutica de un péptido, un peptidomimético, y similares.

5 **[0058]** El término "péptido agonista de GIP" se refiere a un compuesto que se une y activa la señalización aguas abajo del receptor de GIP. Sin embargo, este término no debe interpretarse como una limitación del compuesto de tener actividad en sólo el receptor de GIP. Más bien, los péptidos agonistas de GIP de la presente divulgación pueden mostrar actividades adicionales en otros receptores, tal como se analiza adicionalmente en el presente documento. Los péptidos agonistas de GIP, por ejemplo, pueden mostrar actividad (por ejemplo, actividad agonista) en el receptor de GLP-1. También, el término "péptido agonista de GIP" no debe interpretarse como una limitación del compuesto a sólo los péptidos. Más bien, los compuestos distintos péptidos están abarcados por este término. En consecuencia, el péptido agonista de GIP en algunos aspectos es un péptido en forma de conjugado (un heterodímero, un multímero, un péptido de fusión), un péptido derivatizado químicamente, una sal farmacéutica de un péptido, un peptidomimético, y similares.

15 **[0059]** El término "péptido antagonista de glucagón" se refiere a un compuesto que contrarresta la actividad del glucagón o evita la función de glucagón. Por ejemplo, un antagonista de glucagón muestra al menos 60% de inhibición (por ejemplo, al menos 70%, 80%, 90% o más de inhibición) de la respuesta máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En una realización específica, el antagonista del glucagón a una concentración de aproximadamente 1 μM muestra menos de aproximadamente 20% de la actividad máxima agonista lograda por glucagón en el receptor de glucagón (por ejemplo, menos de aproximadamente 10% o 5%). Este término no debe interpretarse como una limitación del compuesto de tener actividad en sólo el receptor de glucagón. Más bien, los péptidos antagonistas de glucagón de la presente divulgación pueden mostrar actividades adicionales en el receptor de glucagón (por ejemplo, agonismo parcial) u otro receptor. Los péptidos antagonistas de glucagón, por ejemplo, pueden mostrar actividad (por ejemplo, actividad agonista) en el receptor de GLP-1. También, el término "péptido antagonista de glucagón" no debe interpretarse como una limitación del compuesto a sólo los péptidos. Más bien, los compuestos distintos péptidos están abarcados por estos términos. En consecuencia, en algunos aspectos, el péptido agonista de glucagón es un péptido en forma de conjugado, un péptido derivatizado químicamente, una sal farmacéutica de un péptido, un peptidomimético, y similares.

30 **[0060]** El término "péptido antagonista de GLP-1" se refiere a un compuesto que contrarresta la actividad de GLP-1 o evita la función de GLP-1. Por ejemplo, un antagonista de GLP-1 muestra al menos 60% de inhibición (por ejemplo, al menos 70%, 80%, 90% o más de inhibición) de la respuesta máxima alcanzada por GLP-1 en el receptor de GLP-1. En una realización específica, un antagonista de GLP-1 a una concentración de aproximadamente 1 μM muestra menos de aproximadamente 20% de la actividad máxima agonista lograda por GLP-1 en el receptor de GLP-1 (por ejemplo, menos de aproximadamente 10% o 5%). El término no debe interpretarse como una limitación del compuesto de tener actividad en sólo el receptor de GLP-1. Más bien, los péptidos antagonistas de GLP-1 de la presente divulgación pueden mostrar actividades adicionales en el receptor de GLP-1 (por ejemplo, agonismo parcial) u otro receptor. Los péptidos antagonistas de GLP-1, por ejemplo, pueden mostrar actividad (por ejemplo, la actividad agonista) en el receptor de glucagón. También, el término "péptido antagonista de GLP-1" no debe interpretarse como una limitación del compuesto a sólo los péptidos. Más bien, los compuestos distintos péptidos están abarcados por estos términos. En consecuencia, en algunos aspectos, el péptido agonista de GLP-1 es un péptido en forma de conjugado, un péptido derivatizado químicamente, una sal farmacéutica de un péptido, un peptidomimético, y similares.

45 **[0061]** El término "péptido antagonista de GIP" se refiere a un compuesto que contrarresta la actividad GIP o evita la función de GIP-1. Por ejemplo, un antagonista de GIP muestra al menos 60% de inhibición (por ejemplo, al menos 70%, 80%, 90% o más de inhibición) de la respuesta máxima alcanzada por GIP en el receptor de GIP. En una realización específica, un antagonista de GIP a una concentración de aproximadamente 1 μM muestra menos de aproximadamente 20% de la actividad máxima agonista lograda por GIP en el receptor de GIP (por ejemplo, menos de aproximadamente 10% o 5%). El término no debe interpretarse como una limitación del compuesto de tener actividad en sólo el receptor de GIP. Más bien, los péptidos antagonistas de GIP de la presente divulgación pueden mostrar actividades adicionales en el receptor de GIP (por ejemplo, agonismo parcial) u otro receptor. Los péptidos antagonistas de GIP, por ejemplo, pueden mostrar actividad (por ejemplo, actividad agonista) en el receptor de glucagón. También, el término "péptido antagonista de GIP" no debe interpretarse como una limitación del compuesto a sólo los péptidos. Más bien, los compuestos distintos péptidos están abarcados por estos términos. En consecuencia, en algunos aspectos, el péptido agonista de GIP es un péptido en forma de conjugado, un péptido derivatizado químicamente, una sal farmacéutica de un péptido, un peptidomimético, y similares.

60 **[0062]** Tal como se usa en el presente documento, los términos "análogo de glucagón" y "péptido de glucagón" pueden usarse indistintamente para referirse a un análogo del glucagón que tiene la actividad indicada en un receptor de péptido relacionado con glucagón.

65 **[0063]** Tal como se utiliza en el presente documento, el término "glucagón natural" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 1601.

[0064] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "GLP-1 natural" es un término genérico que designa

GLP-1 (7-36) amida (SEQ ID NO: 1603), GLP-1 (7-37) ácido (SEQ ID NO: 1604) o una mezcla de estos dos compuestos.

[0065] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "GIP natural" se refiere a un péptido que consiste en SEQ ID NO: 1607.

[0066] Tal como se usa en el presente documento, "potencia glucagón" o "potencia en comparación con el glucagón natural" de una molécula se refiere a la relación de la EC_{50} de la molécula en el receptor de glucagón dividida por la EC_{50} de glucagón natural en el receptor de glucagón.

[0067] Tal como se usa en el presente documento, "potencia de GLP-1" o "potencia en comparación con GLP-1 natural" de una molécula se refiere a la relación de la EC_{50} de la molécula en el receptor de GLP-1 dividido por la EC_{50} de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

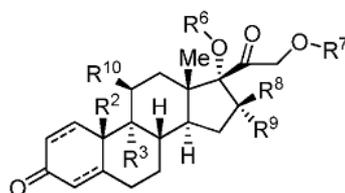
[0068] Tal como se usa en el presente documento, "potencia de GIP" o "potencia en comparación con GIP natural" de una molécula se refiere a la relación de la EC_{50} de la molécula en el receptor de GIP dividida por la EC_{50} de GIP natural en el receptor de GIP.

[0069] Tal como se usa en el presente documento, "ligando de NHR" se refiere a un resto hidrófobo o lipófilo que tiene actividad biológica (ya sea agonista o antagonista) a un receptor nuclear de hormona (NHR). El ligando de NHR es total o parcialmente no peptídico. En algunas realizaciones, el ligando de NHR es un agonista que se une a y activa el NHR. En otras realizaciones, el ligando de NHR es un antagonista. En algunas realizaciones, el ligando de NHR es un antagonista que actúa bloqueando total o parcialmente la unión del ligando natural al sitio activo. En otras realizaciones, el ligando de NHR es un antagonista que actúa mediante la unión al sitio activo o un sitio alostérico y la prevención de la activación o desactivación del NHR.

[0070] Tal como se usa en el presente documento, "ligando de GR" se refiere a un resto hidrófobo o lipófilo que tiene actividad biológica (ya sea agonista o antagonista) en un receptor de glucocorticoides (GR). El ligando de GR es total o parcialmente no peptídico. En algunas realizaciones, el ligando de GR es un agonista que se une a y activa el GR. En otras realizaciones, el ligando de GR es un antagonista. En algunas realizaciones, el ligando de GR es un antagonista que actúa bloqueando total o parcialmente la unión del ligando nativo al sitio activo. En otras realizaciones, el ligando de GR es un antagonista que actúa mediante la unión al sitio activo o un sitio alostérico y la prevención de la activación de, o desactivación, del GR.

[0071] Tal como se usa en el presente documento, "receptores nuclear de hormonas" (NHR) se refieren a proteínas activadas por ligando que regulan la expresión génica dentro del núcleo de la célula, a veces en concierto con otros co-activadores y co-represores.

[0072] Tal como se usa en el presente documento, "cortisol y derivados del mismo" se refiere a compuestos, ya sea de origen natural o sintetizados, de fórmula C:



Fórmula C

en la que R^2 , R^3 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 y R^{10} son cada uno independientemente restos que permiten o promueven la actividad agonista o antagonista tras la unión del compuesto de fórmula C a un receptor de glucocorticoides; y cada línea de trazos representa un doble enlace opcional. En algunas realizaciones, la estructura de la Fórmula C está sustituida con uno o más sustituyentes en una o más posiciones del anillo tetracíclico, tales como, por ejemplo, las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 12, 14, y 15. Los ejemplos no limitativos específicos de derivados de cortisol y derivados de los mismos incluyen cortisol, acetato de cortisona, beclometasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona, trimcinolona y dexametasona.

[0073] Tal como se usa en el presente documento, "grupo de unión" es una molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los grupos de unión pueden proporcionar el espaciado óptimo de las dos entidades, o pueden suministrar además un enlace lábil que permite que las dos entidades se separen entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos hidrolizables, grupos fotoescindibles, restos lábiles en medio ácido, restos lábiles en medio básico y grupos escindibles por enzimas.

[0074] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "profármaco" se define como cualquier compuesto que se somete a modificación química antes de mostrar sus efectos farmacológicos completos.

[0075] Tal como se usa en el presente documento, un "dipéptido" es el resultado de la unión de un α -aminoácido o α -hidroxilácido a otro aminoácido a través de un enlace peptídico.

[0076] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "escisión química" en ausencia de cualquier designación abarca además una reacción no enzimática que da como resultado la rotura de un enlace químico covalente.

REALIZACIONES

[0077] La presente divulgación proporciona péptidos de la superfamilia del glucagón conjugados con ligandos de GR. En algunos aspectos, los ligandos de GR son capaces de actuar en los receptores de glucocorticoides que intervienen en el metabolismo o la homeostasis de la glucosa, y el conjugado proporciona efectos biológicos superiores en el metabolismo o la homeostasis de la glucosa en comparación con el péptido solo o el ligando de GR solo. Sin estar ligado a una teoría de la invención, el ligando de GR puede servir para dirigir el péptido de la superfamilia del glucagón a tipos particulares de células o tejidos; o, alternativamente, el péptido de la superfamilia del glucagón puede servir para dirigir el ligando de GR o mejorar su transporte en la célula, por ejemplo, a través de la unión del péptido a un receptor que internaliza al conjugado.

[0078] Los conjugados peptídicos de la superfamilia de glucagón de la invención pueden representarse mediante la siguiente fórmula:

Q-L-Y

en la que **Q** es un péptido superfamilia del glucagón, **Y** es un ligando de GR, y **L** es un grupo de unión o un enlace.

[0079] El péptido de la superfamilia del glucagón (**Q**) en algunas realizaciones puede ser un péptido relacionado con glucagón que presenta actividad agonista en el receptor de glucagón, actividad agonista en el receptor de GLP-1, actividad agonista en el receptor GIP, actividad co-agonista en los receptores de glucagón y GLP-1, actividad co-agonista en los receptores de glucagón y de GIP, actividad co-agonista en los receptores de GIP y GLP-1, o actividad tri-agonista en los receptores de glucagón, GIP y GLP-1. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón muestra actividad antagonista en el receptor de glucagón, GLP-1 o GIP.

[0080] El péptido de la superfamilia de glucagón (**Q**) en algunas realizaciones puede ser un péptido relacionado con glucagón, hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH; SEQ ID NO: 1619), péptido intestinal vasoactivo (VIP; SEQ ID NO: 1620), polipéptido 27 activador de adenilato ciclasa pituitaria (PACAP-27, SEQ ID No: 1621), péptido histidina metionina (PHM; SEQ ID No: 1622), o Secretina (SEQ ID No: 1623), y/o análogos, derivados y conjugados de los mismos. Los péptidos de la superfamilia de glucagón pueden tener características estructurales comunes, que incluyen la homología dentro de los aminoácidos N-terminales y/o la estructura alfa-helicoidal dentro de la parte C-terminal. Se cree que el extremo C-terminal generalmente funciona en la unión al receptor y el extremo N-terminal generalmente funciona en la señalización del receptor. Algunos aminoácidos en la parte N-terminal y la parte C-terminal están altamente conservados entre los miembros de la superfamilia de glucagón, por ejemplo, His1, Gly4, Phe6, Phe22, Val23, Trp25 y Leu26, con aminoácidos en estas posiciones que muestran identidad, sustituciones conservativas o similitud en las cadenas laterales de aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido **Q** relacionado con glucagón es glucagón (SEQ ID NO: 1601), oxintomodulina (SEQ ID NO: 1606), exendina-4 (SEQ ID NO: 1618), péptido-1 de tipo Glucagón (GLP-1) (aminoácidos 7-37 proporcionados como SEQ ID NO: 1603 y 1604), péptido-2 de tipo Glucagón (GLP-2) (SEQ ID NO: 1608), GIP (SEQ ID NO: 1607) o análogos, derivados y conjugados de los anteriores. En algunas realizaciones, **Q** como péptido relacionado con glucagón comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90 % o 95% idéntica a la secuencia correspondiente de glucagón natural, oxintomodulina natural, exendina-4 natural, GLP-1 natural (7-37), GLP-2 natural o GIP natural sobre la longitud del péptido natural (o sobre las posiciones que corresponden a glucagón, ver por ejemplo, la Figura 1). En otras realizaciones, un péptido de la superfamilia de glucagón (**Q**) comprende una secuencia de aminoácidos de glucagón natural, exendina-4 natural, GLP-1 natural (7-37), GLP-2 natural, GHRH natural, VIP natural, PACAP-27 natural, PHM natural, oxintomodulina natural, secretina natural o GIP natural con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos. En aún otras realizaciones, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos que es una quimera de dos o más secuencias peptídicas relacionadas con glucagón natural. En algunas realizaciones, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 50% idéntica a glucagón natural (SEQ ID NO: 1601) que retiene la conformación de hélice alfa de los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 12-29.

[0081] En aspectos relacionados, la divulgación proporciona conjugados de péptidos representados por la fórmula

Q-L-Y

en la que **Q** es osteocalcina, calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos, en lugar de un péptido de la superfamilia de glucagón; **Y** es un ligando de GR; y **L** es un grupo de unión o un enlace. En algunas realizaciones, **Q** comprende osteocalcina (SEQ ID NO: 1644), o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80 %, 85%, 90% o 95% idéntica a la osteocalcina natural sobre la longitud del péptido natural. **Q** puede comprender un análogo de la osteocalcina con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos en relación con la osteocalcina natural, o un análogo truncado de osteocalcina (por ejemplo, aminoácidos 70-84) con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos en relación con la osteocalcina truncada natural. En algunas realizaciones, **Q** comprende calcitonina (SEQ ID NO: 1645), o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80 %, 85%, 90% o 95% idéntica a calcitonina natural sobre la longitud del péptido natural. **Q** puede comprender un análogo de calcitonina con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la calcitonina natural. En algunas realizaciones, **Q** comprende amilina (SEQ ID NO: 1646), o una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80 %, 85%, 90% o 95% idéntica a la amilina natural sobre la longitud del péptido natural. **Q** puede comprender un análogo de amilina con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la amilina natural.

El ligando de GR (Y)

[0082] En la presente divulgación con respecto a los conjugados **Q-L-Y**, **Y** es un ligando que actúa en un receptor de glucocorticoides. Los receptores nucleares de hormonas, tales como GR, incluyen al menos uno de dominio de unión a ADN (DBD) de dedo de zinc de tipo C₄ y/o un dominio de unión a ligando (LBD). El DBD funciona para unirse al ADN en la vecindad de los genes diana, y el LBD se une y responde a su hormona afín. "Receptores de hormonas nucleares clásicos" poseen un DBD y un LBD (por ejemplo, receptor de estrógenos alfa), mientras que otros receptores nucleares de hormonas poseen solamente un DBD (por ejemplo Knirps, ORD) o sólo un LBD (por ejemplo, *short heterodimer partner* (SHP)).

[0083] Los receptores nucleares de hormonas se pueden dividir en cuatro clases mecanísticas: Tipo I, Tipo II, Tipo III y Tipo IV. La unión del ligando a los receptores de Tipo I (grupo NR3) da como resultado la disociación de las proteínas de choque térmico (HSP) del receptor, la homodimerización del receptor, la translocación desde el citoplasma hacia el núcleo de la célula, y la unión a elementos de respuesta hormonal de repetición invertida (HRE) de ADN. El complejo receptor nuclear/ADN recluta a continuación otras proteínas que transcriben el ADN aguas abajo de los HRE en ARN mensajero. Los receptores de tipo II (grupo NR1) son retenidos en el núcleo y se unen como heterodímeros, generalmente con receptores de Retinoide X (RXR), al ADN. Los receptores nucleares de hormonas de tipo II son a menudo complejos con proteínas corepresoras. La unión de ligando al receptor de tipo II provoca la disociación del corepresor y el reclutamiento de las proteínas coactivadoras. Se reclutan proteínas adicionales para el complejo receptor nuclear/ADN que transcriben ADN en ARN mensajero. Los receptores nucleares de hormonas de Tipo III (grupo NR2) son receptores huérfanos que se unen a HRE de repetición directa de ADN como homodímeros. Los receptores nucleares de hormonas de Tipo IV se unen al ADN como monómeros o dímeros. Los receptores de Tipo IV son únicos porque un único dominio de unión al ADN del receptor se une a un único HRE de medio sitio. El ligando de NHR puede ser un ligando que actúa en uno cualquiera o más de receptores nucleares de hormonas de Tipo I, Tipo II, Tipo III o Tipo IV (por ejemplo, como un agonista o antagonista).

Tabla 1. Superfamilia de receptores nucleares de hormonas

	Receptor nuclear de hormona	Especie	Acceso	Ligando endógeno
Grupo NR1				
NR1A1	Receptor alfa de hormona tiroides (TR α)	Humana	M24748	Hormona tiroides
NR1A2	Receptor beta de hormona tiroides (TR β)	Humana	X04707	
NR1B1	Receptor alfa de ácido retinoico (RAR α)	Humana	X06538	Vitmaina A y compuestos relacionados
NR1B2	Receptor beta de ácido retinoico (RAR β)	Humana	Y00291	
NR1B3	Receptor gamma de ácido retinoico (RAR γ)	Humana	M57707	
NR1C ₁	Receptor alfa activado por proliferadores de proxisoma (PPAR α)	Humana	L02932	Ácidos grasos, prostaglandinas
NR1C ₂	Receptor beta/delta activado por proliferadores de proxisoma (PPAR β/δ)	Humana	L07592	
NR1C ₃	Receptor gamma activado por proliferadores de proxisoma (PPAR γ)	Humana	L40904	

ES 2 672 880 T3

NR1D1	Rev-ErbA α	Humana	M24898	Hemoglobina
NR1D2	Rev-ErbA β	Humana	L31785	
NR1F1	Receptor alfa huérfano relacionado con RAR (ROR α)	Humana	U04897	Colesterol, ácido retinoico todo-trans
NR1F2	Receptor beta huérfano relacionado con RAR (ROR β)	Humana	Y08639	
NR1F3	Receptor gamma huérfano relacionado con RAR (ROR γ)	Humana	U16997	
NR1H2	Receptor X hepático beta (LXR β)	Humana	U07132	Oxisterol
NR1H3	Receptor X hepático alfa (LXR α)	Humana	U22622	
NR1H4	Receptor X farnesoide (FXR)	Humana	U68233	
NR1I1	Receptor de vitamina D (VDR)	Humana	J03258	Vitamina D
NR1I2	Receptor X de pregnano	Humana	AF061056	Xenobióticos (dexametasona, rifapicina)
NR1I3	Receptor alfa constitutivo de androstano	Humana	Z30425	Androstano
Grupo NR2				
NR2A1	Factor nuclear 4 alfa de hepatocito (HNF4 α)	Humana	X76930	Ácidos grasos
NR2A3	Factor nuclear 4 gamma de hepatocito (HNF4 γ)	Humana	Z49826	Ácidos grasos
NR2B1	Receptor X retinoide alfa (RXR α)	Humana	X52773	Retinoides
NR2B2	Receptor X retinoide beta (RXR β)	Humana	M84820	
NR2B3	Receptor X retinoide gamma (RXR γ)	Humana	U38480	
NR2C ₁	Receptor 2 testicular (TR2)	Humana	M29960	
NR2C ₂	Receptor 4 testicular (TR4)	Humana	L27586	
NR2E1	Homólogo humano del gen tailless de Drosophila (TLX)	Humana	Y13276	
NR2E3	Receptor nuclear específico de fotoreceptor (PNR)	Humana	AF121129	
NR2F1	Factor de transcripción I del promotor en dirección 5' de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TFI)	Humana	X12795	
NR2F2	Factor de transcripción II del promotor en dirección 5' de la ovoalbúmina de pollo (COUP-TFII)	Humana	M64497	
NR2F6	Gen relacionado con V-erAA	Humana	X12794	
Grupo NR3				
NR3A1	Receptor alfa de estrógeno (ER α)	Humana	P03372	Estrógeno
NR3A2	Receptor beta de estrógeno (ER β)	Humana	AB006590	
NR3B1	Receptor alfa relacionado de estrógeno (ERR α)	Humana	X51416	
NR3B2	Receptor beta relacionado de estrógeno (ERR β)	Humana	AF094517	
NR3B3	Receptor gamma relacionado de estrógeno (ERR γ)	Humana	AF058291	
NR3C ₁	Receptor glucocorticoide (GR)	Humana	X03225	Cortisol
NR3C ₂	Receptor mineralocorticoide (MR)	Humana	M16801	Aldosterona
NR3C ₃	Receptor de progesterona (PR)	Humana	M15716	Progesterona
NR3C ₄	Receptor de andrógeno (AR)	Humana	M20132	Testosterona
Grupo NR4				
NR4A1	Factor IB alfa del factor de crecimiento nervioso (NGFI-B α)	Humana	L13740	
NR4A2	Factor IB beta del factor de crecimiento nervioso (NGFI-B β)	Humana	X75918	
NR4A3	Factor IB gamma del factor de crecimiento nervioso (NGFI-B γ)	Humana	D78579	
Grupo NR5				
NR5A1	Factor 1 esteroideogénico (SF1)	Humana	U76388	
NR5A2	Homólogo 1 de receptor hepático	Humana	U93553	

	(LRH-1)			
Grupo NR6				
NR6A1	Factor nuclear de células germinales	Humana	U64876	
Subgrupo NR0B (tienen solo LBD, no DBD)				
NR0B1	DAX1	Humana		
NR0B2	Short heterodimer partner (SHP)	Humana		

Los datos de la tabla se toman de Laudet y Gronemeyer "The Nuclear Receptor Facts Book", Academic Press. La clasificación ID se refiere a un código de clasificación para cada miembro y el acceso se refiere al código de acceso de nucleótidos de NCBI GenBank

5

Actividad del ligando de GR (Y)

[0084] En algunas realizaciones, **Y** presenta una EC₅₀ para la activación de GR (o en el caso de un antagonista, una IC₅₀) de aproximadamente 10 mM o menos, o 1 mM (1.000 µM) o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 µM o menos, aproximadamente 500 µM o menos, aproximadamente 250 µM o menos, aproximadamente 100 µM o menos, aproximadamente 75 µM o menos, aproximadamente 50 µM o menos, aproximadamente 25 µM o menos, aproximadamente 10 µM o menos, aproximadamente 7,5 µM o menos, aproximadamente 6 µM o menos, aproximadamente 5 µM o menos, aproximadamente 4 µM o menos, aproximadamente 3 µM o menos, aproximadamente 2 µM o menos, o aproximadamente 1 µM o menos). En algunas realizaciones, **Y** muestra una EC₅₀ o IC₅₀ en un receptor de glucocorticoides de aproximadamente 1.000 nM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 7,5 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos). En algunas realizaciones, **Y** tiene una EC₅₀ o IC₅₀ en un receptor de glucocorticoides, que está en el intervalo picomolar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, **Y** muestra una EC₅₀ o IC₅₀ en un receptor de glucocorticoides de aproximadamente 1.000 pM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 250 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 75 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente o menos, aproximadamente 18 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 16 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos o de aproximadamente 1 pM o menos).

[0085] En algunas realizaciones, **Y** presenta una EC₅₀ o IC₅₀ en un receptor de glucocorticoides que es de aproximadamente 0,001 pM o más, o aproximadamente 0,01 pM o más, o aproximadamente 0,1 pM o más. La activación del receptor de glucocorticoides (actividad del receptor de glucocorticoides) se puede medir in vitro por cualquier ensayo conocido en la técnica. Por ejemplo, la actividad en el receptor nuclear de hormona puede medirse mediante la expresión del receptor en células de levadura que también albergan un gen indicador (por ejemplo, *lacZ* que codifica β-galactosidasa) bajo el control de un promotor sensible a hormonas. Por lo tanto, en presencia de un ligando que actúa en el receptor, el gen informador se expresa y la actividad del producto del gen informador puede medirse (por ejemplo, mediante la medición de la actividad de β-galactosidasa en la descomposición de un sustrato cromogénico, tal como clorofenol rojo-β-D-galactopiranosido (CPRG), que es inicialmente de color amarillo, en un producto de color rojo que se puede medir por absorbancia). Véase, por ejemplo, Jungbauer y Beck, J. Chromatog. B, 77: 167-178 (2002); Routledge y Sumpter, J. Biol. Chem, 272: 3280-3288 (1997); Liu et al., J. Biol. Chem., 274: 26654-26660 (1999). La unión del ligando de GR al receptor de glucocorticoides puede determinarse usando cualquier ensayo de unión conocido en la técnica tal como, por ejemplo, polarización por fluorescencia o un ensayo radiactivo. Véase, por ejemplo, Ranamoorthy et al, 138 (4): 1520-1527 (1997).

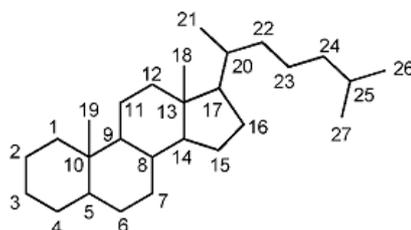
[0086] En algunas realizaciones, **Y** muestra aproximadamente 0,001% o más, aproximadamente 0,01% o más, aproximadamente 0,1% o más, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 100% o más, aproximadamente 125% o más, aproximadamente 150% o más, aproximadamente 175% o más, aproximadamente 200% o más, aproximadamente 250% o más, aproximadamente 300% o más, aproximadamente 350% o más, aproximadamente 400% o más, aproximadamente 450% o más, o aproximadamente 500 % o mayor actividad en el receptor de glucocorticoides en relación al glucocorticoides natural (potencia del glucocorticoides). En algunas realizaciones, **Y** muestra aproximadamente 5000% o menos o aproximadamente 10000% o menos actividad en el receptor de glucocorticoides en relación al glucocorticoide natural. La actividad de **Y** en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de las EC₅₀ para **Y** frente al ligando natural. En algunas realizaciones, **Y** es el ligando natural del receptor.

Estructura del ligando de GR (Y)

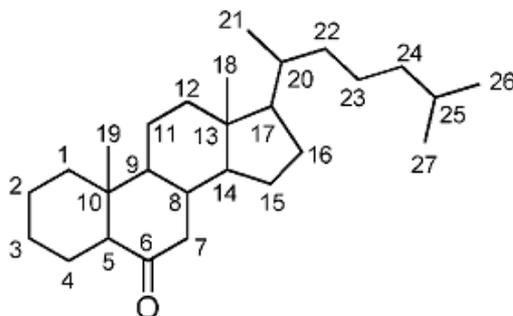
[0087] El ligando de GR de la invención (**Y**) es total o parcialmente no peptídico y es hidrófobo o lipófilo. En algunas realizaciones, el ligando de GR tiene un peso molecular que es de aproximadamente 5.000 daltons o menos, o aproximadamente 4.000 daltons o menos, o aproximadamente 3.000 daltons o menos, o aproximadamente 2.000 daltons o menos, o aproximadamente 1.750 daltons o menos, o aproximadamente 1.500 daltons o menos, o aproximadamente 1.250 daltons o menos, o aproximadamente 1.000 daltons o menos, o aproximadamente 750 daltons o menos, o aproximadamente 500 daltons o menos, o aproximadamente 250 daltons o menos. La estructura de **Y** puede estar según cualquiera de las enseñanzas descritas en el presente documento.

[0088] En las realizaciones descritas en el presente documento, **Y** se conjuga con **L** (por ejemplo, cuando **L** es un grupo de unión) o **Q** (por ejemplo, cuando **L** es un enlace) en cualquier posición de **Y** que es capaz de reaccionar con **Q** o **L**. Un experto en la técnica podría determinar fácilmente la posición y los medios de conjugación en vista del conocimiento general y la divulgación proporcionada en el presente documento.

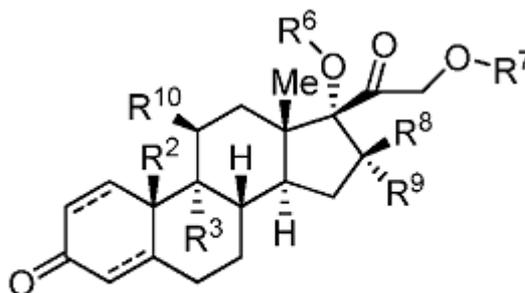
[0089] En cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, en las que **Y** comprende un esqueleto tetracíclico que tiene tres anillos de 6 miembros unidos a un anillo de 5 miembros o una variación del mismo (por ejemplo, un **Y** que actúa en el receptor de la vitamina D), los átomos de carbono de el esqueleto son referidos por el número de posición, tal como se muestra a continuación:



[0090] Por ejemplo, una modificación que tiene una cetona en la posición 6 se refiere a la siguiente estructura:



[0091] En todas realizaciones, **Y** actúa en un receptor de glucocorticoides (GR). En algunas realizaciones, **Y** comprende cualquier estructura que permite o promueve la actividad agonista en el GR, mientras que en otras realizaciones **Y** es un antagonista de GR. En realizaciones de ejemplo, **Y** comprende una estructura de fórmula C:



Fórmula C

en la que R^2 , R^3 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 y R^{10} son cada uno independientemente restos que permiten o promueven la

actividad agonista o antagonista tras la unión del compuesto de fórmula C al GR; y cada línea de trazos representa un doble enlace opcional. En algunas realizaciones, la Fórmula C comprende además uno o más sustituyentes en una o más de las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 14, y 15 (por ejemplo, hidroxilo o cetona en la posición 11).

5 En algunas realizaciones, Y comprende una estructura de fórmula C en la que

10 **[0092]** R² es hidrógeno, (alquilo C₀-C₈) halo, (alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, (alquinilo C₀-C₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo, (alquilo C₀-C₈) Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OH, (alquilo C₀-C₈) SH, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴H 2, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)H, (alquilo C₀-C₈)C(O)arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)OH, (alquilo C₀-C₈)C(O)O arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)O heteroarilo, (alquilo C₀-C₈) OC(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)alquenilo C₂-C₁₈, (C 0 -C 8 alquil) OC(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴H₂, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴heteroarilo, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)alquenilo C₂-C₁₈, o (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)OH, (alquilo C₀-C₈) OC(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)OC(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)OH, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴H 2, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, o (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)OH;

25 **[0093]** R³ es hidrógeno, (alquilo C₀-C₈) halo, (alquilo C₀-C₈, (alquenilo C₂-C₁₈, alquinilo C₂-C₁₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo, (alquilo C₀-C₈) Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OH, (alquilo C₀-C₈) SH, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴H 2, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)H, (alquilo C₀-C₈)C(O)arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)OH, (alquilo C₀-C₈)C(O)O arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)O heteroarilo, (alquilo C₀-C₈) OC(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴H₂, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴heteroarilo, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)alquenilo C₂-C₁₈, o (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴C(O)OH, (alquilo C₀-C₈) OC(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)OH, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) OC(O)NR²⁴H₂, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, o (alquilo C₀-C₈) NR²⁴(O)OH;

40 **[0094]** R⁶ es hidrógeno, (alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, alquinilo C₂-C₁₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)H, (alquilo C₀-C₈)C(O)arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)OH, (alquilo C₀-C₈)C(O)O arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)O heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (C 0-C 8 alquilo)C(O)NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O) NR²⁴H₂, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴arilo, o (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴heteroarilo;

50 **[0095]** R⁷ es hidrógeno, (alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, alquinilo C₂-C₁₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)H, (alquilo C₀-C₈)C(O)arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)O-alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)OH, (alquilo C₀-C₈)C(O)O arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)O heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquilo C₁-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquenilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquinilo C₂-C₁₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴H 2, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴arilo, o (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴heteroarilo;

55 **[0096]** R⁸ es hidrógeno, (alquilo C₀-C₈) halo, (alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, alquinilo C₂-C₁₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo;

60 **[0097]** R⁹ es hidrógeno, (alquilo C₀-C₈) halo, (alquilo C₁-C₁₈, alquenilo C₂-C₁₈, alquinilo C₂-C₁₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo;

[0098] R¹⁰ es hidrógeno, (alquilo C₀-C₈) halo, (alquilo C₁-C₁₈, o (alquilo C₀-C₈) OH; y

65 **[0099]** R²⁴ es hidrógeno o (alquilo C₁-C₁₈).

En algunas realizaciones, **Y** comprende una estructura de Fórmula C, en la que

[0100] R² es hidrógeno, halo, OH, o alquilo C₁-C₇;

5 **[0101]** R³ es hidrógeno, halo, OH, o alquilo C₁-C₇;

10 **[0102]** R⁶ es hidrógeno, alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquilo C₁-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alqueno C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquino C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)H, (alquilo C₀-C₈)C(O)arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquilo C₁-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalqueno C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquino C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)OH, (alquilo C₀-C₈)C(O)O arilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)O heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquilo C₁-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alqueno C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴alquino C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴H₂, (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴arilo, o (alquilo C₀-C₈)C(O)NR²⁴heteroarilo;

15 **[0103]** R⁷ es hidrógeno, alquilo C₁-C₈, alqueno C₂-C₈, alquino C₂-C₈, heteroalquilo, (alquilo C₀-C₈) arilo, (alquilo C₀-C₈) heteroarilo, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquilo C₁-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alqueno C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)alquino C₂-C₈, (C₀)C(O)arilo, (C₀)C(O)heteroarilo, (C₀)C(O)Oalquilo C₁-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalqueno C₂-C₈, (alquilo C₀-C₈)C(O)Oalquino C₂-C₈, o (alquilo C₀-C₈)C(O)OH;

20 **[0104]** R⁸ es hidrógeno o alquilo C₁-C₇;

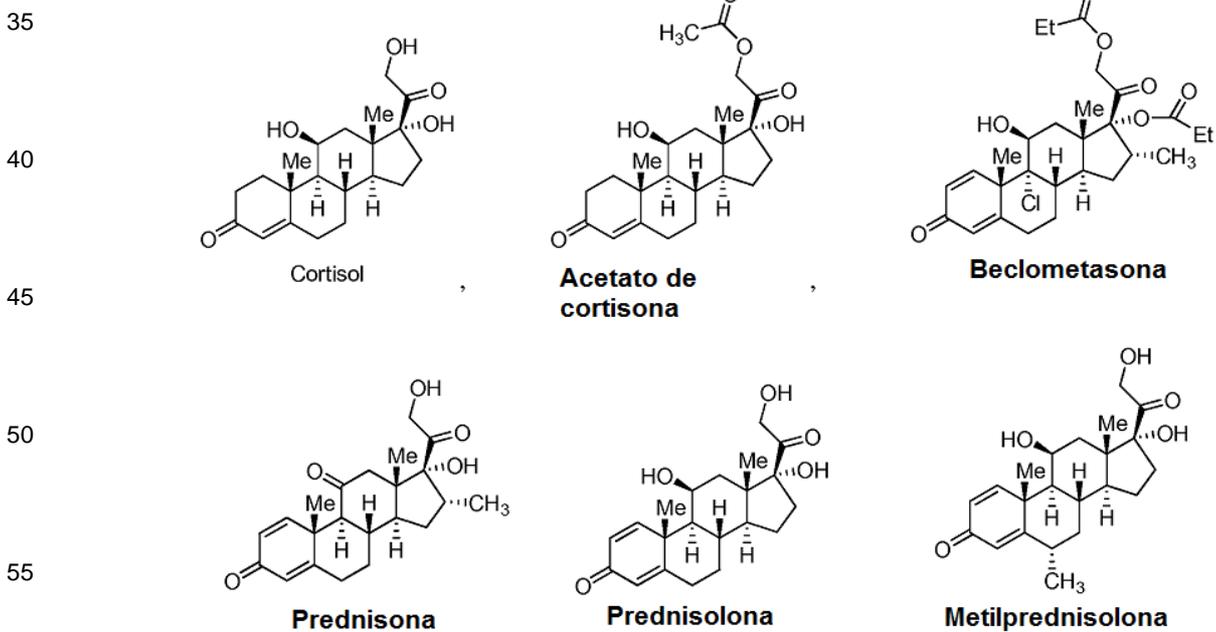
[0105] R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₇;

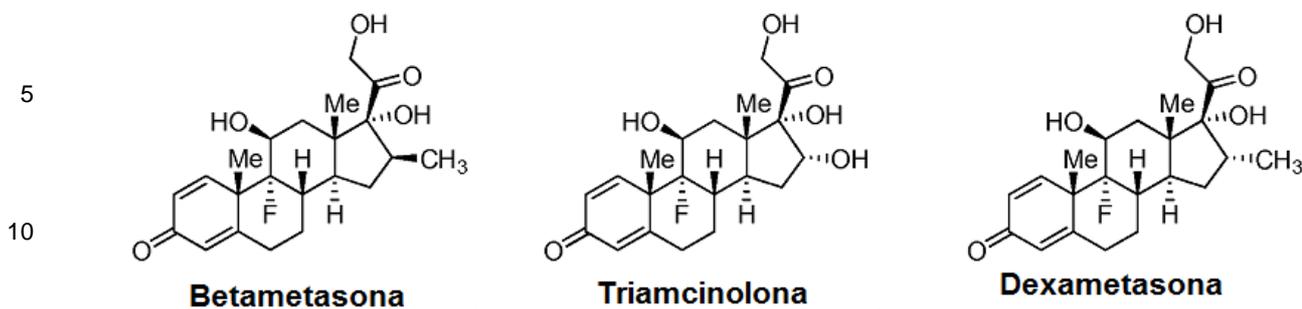
25 **[0106]** R¹⁰ es hidrógeno o OH; y

[0107] R²⁴ es hidrógeno o alquilo C₁-C₇.

30 **[0108]** Por ejemplo, R² es hidrógeno o metilo; R³ es hidrógeno, fluoro, cloro, o metilo; R⁶ es hidrógeno o C(O) alquilo C₁-C₇; R⁷ es hidrógeno, C(O)CH₃ o C(O)CH₂CH₃; R⁸ es hidrógeno o metilo; R⁹ es hidrógeno o metilo; y R¹⁰ es hidroxilo.

[0109] Los ejemplos no limitantes de estructuras de la Fórmula C incluyen:





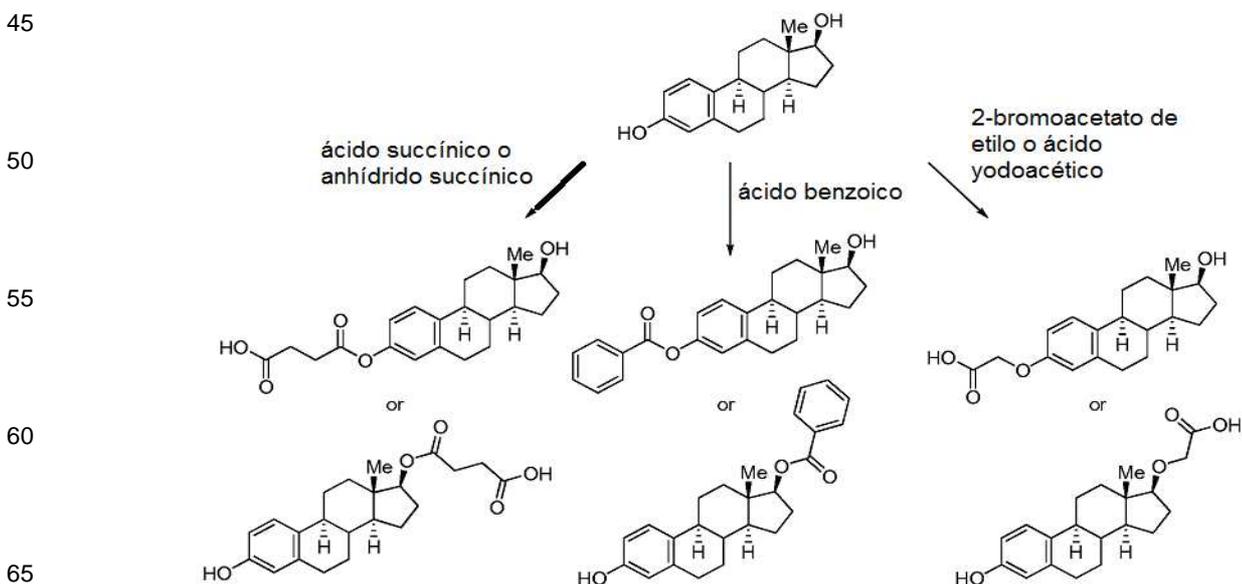
15 y derivados de los mismos.

[0110] En realizaciones en las que **Y** comprende una estructura de fórmula **C**, **Y** se conjuga con **L** (por ejemplo, cuando **L** es un grupo de unión) o **Q** (por ejemplo, cuando **L** es un enlace) en cualquier posición de la Fórmula **C** que es capaz de reaccionar con **Q** o **L**. Un experto en la técnica podría determinar fácilmente la posición de la conjugación en la fórmula **C** y los medios de conjugación de la Fórmula **C** a **Q** o **L** en vista del conocimiento general y la descripción proporcionada en el presente documento. En algunas realizaciones, la Fórmula **C** está conjugada a **L** o **Q** en cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23 de la fórmula **C**. En algunas realizaciones, la Fórmula **C** está conjugada a **L** o **Q** en la posición 3, 10, 16 o 17 de la Fórmula **C**. En realizaciones preferidas, la fórmula **C** está conjugada a **L** o **Q** en la posición 3 o 17 de la fórmula **C**.

25 Modificación del ligando de GR (**Y**)

[0111] En algunas realizaciones, el ligando de GR se derivatiza o, en cualquier caso, se modifica químicamente para comprender un resto reactivo que es capaz de reaccionar con el péptido de la superfamilia del glucagón (**Q**) o el grupo de unión (**L**). En las realizaciones descritas en el presente documento, **Y** se derivatiza en cualquier posición de **Y** que es capaz de reaccionar con **Q** o **L**. La posición de derivatización en **Y** es evidente para un experto en la técnica y depende del tipo de ligando de GR utilizado y la actividad que se desea. Por ejemplo, en realizaciones en las que **Y** tiene una estructura que comprende un esqueleto tetracíclico que tiene tres anillos de 6 miembros unidos a un anillo de 5 miembros o una variación de los mismos, **Y** se puede derivatizar en cualquiera de las posiciones 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25. Otras posiciones de derivatización pueden ser como se han descrito anteriormente en el presente documento.

[0112] El ligando de GR puede ser derivatizado usando cualquier agente conocido para un experto en la técnica o tal como se describe en el presente documento (por ejemplo, consulte la sección *El grupo de unión* y la subsección *Modificación química de Q y/o Y*). Por ejemplo, el estradiol se puede derivatizar con ácido succínico, anhídrido succínico, ácido benzoico, 2-bromoacetato de etilo o ácido yodoacético para formar los derivados siguientes de estradiol que son capaces de conjugarse a **Q** o **L**.



[0113] Del mismo modo, cualquiera de los ligandos de GR mencionados anteriormente se pueden derivatizar por procedimientos conocidos en la técnica. Además, ciertos ligandos derivatizados están comercialmente disponibles y se pueden adquirir en empresas químicas, tales como Sigma-Aldrich.

5 El Péptido de la superfamilia de glucagón (Q)

[0114] En los conjugados **Q-L-Y** descritos en el presente documento, **Q** es un péptido de la superfamilia del glucagón. Un péptido de la superfamilia de glucagón se refiere a un grupo de péptidos relacionados en estructura en sus regiones N-terminal y/o regiones C-terminal (véase, por ejemplo, Sherwood et al, Endocrine Reviews 21: 619-670 (2000)).

[0115] Se cree que el extremo C-terminal generalmente funciona en la unión al receptor y el extremo N-terminal generalmente funciona en la señalización del receptor. Unos pocos aminoácidos en las regiones N-terminal y C-terminal están muy conservados entre los miembros de la superfamilia del glucagón. Algunos de estos aminoácidos conservados incluyen His1, Gly4, Phe6, Phe22, Val23, Trp25 y Leu26, mostrando los aminoácidos en estas posiciones identidad, sustituciones conservativas o similitud en la estructura de sus cadenas laterales de aminoácidos.

[0116] Los péptidos de la superfamilia del glucagón incluyen péptidos relacionados con glucagón, la hormona liberadora de la hormona del crecimiento (GHRH; SEQ ID NO: 1619), el péptido intestinal vasoactivo (VIP; SEQ ID NO: 1620), el polipéptido 27 activador de la adenilato ciclasa pituitaria (PACAP-27; SEQ ID NO: 1621), el péptido histidina isoleucina (PHI; SEQ ID NO: 1542), el péptido histidina metionina (PHM; SEQ ID NO: 1622), la secretina (SEQ ID NO: 1623), y/o análogos, derivados o conjugados de los mismos. En algunas realizaciones, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos del glucagón natural, la exendina-4 natural, GLP-1 natural (7-37), GLP-2 natural, GHRH natural, VIP natural, PACAP-27 natural, PHM natural, oxintomodulina natural, secretina natural, o GIP natural con hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 modificaciones de aminoácidos.

[0117] En algunos aspectos de esta invención, **Q** es un péptido relacionado con glucagón, tal como, por ejemplo, el glucagón (SEQ ID NO: 1601), oxintomodulina (SEQ ID NO: 1606), exendina-4 (SEQ ID NO: 1618), péptido 1 de tipo glucagón (GLP-1) (aminoácidos 7-36 proporcionados como SEQ ID NO: 1603; aminoácidos 7-37 se proporcionan como SEQ ID NO: 1604), péptido 2 similar al glucagón (GLP 2, SEQ ID NO: 1608), péptido inhibidor gástrico (GIP, SEQ ID NO: 1607) o análogos, derivados y conjugados de los mismos. Un péptido relacionado con glucagón tiene actividad biológica (tal como un agonista o antagonista) en uno cualquiera o más de los receptores de glucagón, GLP-1, GLP-2, y GIP y comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 20% de identidad de secuencia (por ejemplo, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%) con al menos una de glucagón natural, oxintomodulina natural, exendina-4 natural, GLP-1 (7-37) natural, GLP-2 natural, o GIP natural sobre la longitud del péptido (o sobre las posiciones que corresponden a glucagón, véase por ejemplo la figura 1).

[0118] Se entiende que todos los posibles subconjuntos de actividad de los péptidos relacionados con glucagón se contemplan, por ejemplo, péptidos que tienen actividad biológica (como agonistas o antagonistas) en uno cualquiera o más de los receptores de glucagón o GLP-1 o GIP, junto con todos los posibles subconjuntos de identidad de secuencia para cada péptido natural en la lista, por ejemplo, comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de identidad de secuencia con GLP-1 natural sobre la longitud de GLP-1 natural. En algunas realizaciones de la descripción, el péptido relacionado con el glucagón es un péptido que tiene actividad agonista del receptor de glucagón, actividad agonista de receptor de GLP-1, actividad agonista del receptor de GIP, actividad co-agonista del receptor de glucagón/receptor de GLP-1, actividad co-agonista del receptor de glucagón/receptor de GIP, actividad co-agonista del receptor de GLP-1/receptor de GIP, actividad triagonista de receptor de glucagón/receptor de GLP-1/receptor de GIP, actividad antagonista del receptor de glucagón, o actividad antagonista del receptor de glucagón/agonista del receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, el péptido conserva una conformación de hélice alfa en la mitad C-terminal de la molécula. En algunas realizaciones, el péptido conserva posiciones implicadas en la interacción o señalización del receptor, por ejemplo la posición 3 del glucagón, o la posición 7, 10, 12, 13, 15 o 17 de GLP-1 (7-37). En consecuencia, el péptido relacionado con glucagón puede ser un péptido de Clase 1, Clase 2, Clase 3, Clase 4, y/o Clase 5, cada uno de los cuales se describe adicionalmente en el presente documento.

[0119] **Q** también puede ser cualquiera de los péptidos de la superfamilia del glucagón que son conocidos en la técnica, algunos de los que se describen en el presente documento a modo de ejemplos no limitativos. Una variedad de análogos de GLP-1 son conocidos en la técnica y son un péptido relacionado con glucagón, tal como se describe en el presente documento, véase, por ejemplo, WO 2008023050, WO 2007030519, WO 2005058954, WO 2003011892, WO 2007046834, WO 2006134340, WO 2006124529, WO 2004022004, WO 2003018516, WO 2007124461. En cualquiera de las realizaciones, **Q** puede ser un péptido relacionado con glucagón descrito en los documentos WO 2007/056362, WO 2008/086086, WO 2009/155527, WO 2008/101017, WO 2009/155258, WO 2009/058 662, WO 2009/058734, WO 2009/099763, WO 2010/011439, solicitud de patente PCT No. US09/68745, y la Solicitud de Patente de Estados Unidos N° 61/187.578. En ciertas realizaciones, **Q** es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, Clase 3, Clase 4, o Clase 5, tal como se detalla en el presente documento. En

cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, **Q** es cualquiera de SEQ ID NOs: 1-760, 801-919, 1001-1275, 1301-1371, 1401-1518, 1601-1650. En algunas realizaciones, **Q** es cualquiera de las SEQ ID NOs: 1647-1650.

5 Actividad del péptido de la superfamilia del glucagón péptido (Q)

Actividad en el receptor de glucagón

[0120] En algunas realizaciones, **Q** presenta una EC₅₀ para la activación del receptor de glucagón (o una IC₅₀ para el antagonismo del receptor de glucagón) de aproximadamente 10 mM o menos, o aproximadamente 1 mM (1.000 μM) o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 μM o menos, aproximadamente 500 μM o menos, aproximadamente 250 μM o menos, aproximadamente 100 μM o menos, aproximadamente 75 μM o menos, aproximadamente 50 μM o menos, aproximadamente 25 μM o menos, aproximadamente 10 μM o menos, aproximadamente 7,5 μM o menos, aproximadamente 6 μM o menos, aproximadamente 5 μM o menos, aproximadamente 4 μM o menos, aproximadamente 3 μM o menos, aproximadamente 2 μM o menos, o aproximadamente 1 μM o menos). En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC₅₀ o IC₅₀ en el receptor de glucagón de aproximadamente 1000 nM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 7,5 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC₅₀ o IC₅₀ en el receptor de glucagón que está en el intervalo picomolar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, **Q** muestra una EC₅₀ o IC₅₀ en el receptor de glucagón de aproximadamente 1000 pM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 250 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 75 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 7,5 pM o menos, aproximadamente 6 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 4 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos o de aproximadamente 1 pM o menos).

[0121] En algunas realizaciones, **Q** presenta una EC₅₀ o IC₅₀ en el receptor de glucagón que es de aproximadamente 0,001 pM o más, aproximadamente 0,01 pM o más, o aproximadamente 0,1 pM o más. La activación del receptor de glucagón (actividad del receptor de glucagón) se puede medir por ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor de glucagón, por ejemplo, el ensayo de células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor de glucagón y un gen luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc como se describe en el Ejemplo 2.

[0122] En algunas realizaciones, **Q** muestra aproximadamente 0,001% o más, aproximadamente 0,01% o más, aproximadamente 0,1% o más, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 100% o más, aproximadamente 125% o más, aproximadamente 150% o más, aproximadamente 175% o más, aproximadamente 200% o más, aproximadamente 250% o más, aproximadamente 300% o más, aproximadamente 350% o más, aproximadamente 400% o más, aproximadamente 450% o más, o aproximadamente 500 % o mayor actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural (potencia glucagón). En algunas realizaciones, **Q** muestra aproximadamente 5.000% o menos o aproximadamente 10.000% o menos actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural. La actividad de **Q** en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de EC₅₀ para **Q** en comparación con el ligando natural.

[0123] En algunas realizaciones, **Q** muestra actividad (potencia) sustancial en sólo el receptor de glucagón y poca o ninguna actividad en el receptor de GLP-1 o el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** es considerado como un "agonista del receptor de glucagón puro" o no se considera como un "coagonista del receptor de glucagón/GLP-1" o un "coagonista del receptor de glucagón/GIP". En algunas realizaciones, **Q** presenta cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de glucagón descritos en el presente documento, pero tiene sustancialmente menos actividad (potencia) en el receptor de GLP-1 o el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC₅₀ en el receptor de GLP-1 que es 100 veces o mayor que la EC₅₀ en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC₅₀ en el receptor de GIP, que es 100 veces o mayor que la EC₅₀ en el receptor de glucagón.

Actividad en el receptor de GLP-1

[0124] En algunas realizaciones, **Q** presenta una EC₅₀ para la activación del receptor de GLP-1 (o una IC₅₀ para el antagonismo del receptor de GLP-1) de aproximadamente 10 mM o menos, o aproximadamente 1 mM (1.000 μM) o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 μM o menos, aproximadamente 500 μM o menos, aproximadamente 250

5 μM o menos, aproximadamente 100 μM o menos, aproximadamente 75 μM o menos, aproximadamente 50 μM o menos, aproximadamente 25 μM o menos, aproximadamente 10 μM o menos, aproximadamente 7,5 μM o menos, aproximadamente 6 μM o menos, aproximadamente 5 μM o menos, aproximadamente 4 μM o menos, aproximadamente 3 μM o menos, aproximadamente 2 μM o menos, o aproximadamente 1 μM o menos). En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} o IC_{50} para la activación del receptor de GLP-1 de aproximadamente 1000 nM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 nM o menos, aproximadamente 500 nM o menos, aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 7,5 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC_{50} o IC_{50} en el receptor de GLP-1 que está en el intervalo picomolar. Por consiguiente, en algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} o IC_{50} para la activación del receptor de GLP-1 de aproximadamente 1000 pM o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 pM o menos, aproximadamente 500 pM o menos, aproximadamente 250 pM o menos, aproximadamente 100 pM o menos, aproximadamente 75 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 7,5 pM o menos, aproximadamente 6 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 4 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos o de aproximadamente 1 pM o menos).

20 **[0125]** En algunas realizaciones, **Q** presenta una EC_{50} o IC_{50} en el receptor de GLP-1 que es de aproximadamente 0,001 pM o más, aproximadamente 0,01 pM o más, o aproximadamente 0,1 pM o más. La activación del receptor de GLP-1 (actividad del receptor de GLP-1) se puede medir por ensayos in vitro que miden la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor de GLP-1, por ejemplo, el ensayo de células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor de GLP-1 y un gen luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc como se describe en el Ejemplo 2.

30 **[0126]** En algunas realizaciones, **Q** muestra aproximadamente 0,001% o más, aproximadamente 0,01% o más, aproximadamente 0,1% o más, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, aproximadamente 20% o más, aproximadamente 30% o más, aproximadamente 40% o más, aproximadamente 50% o más, aproximadamente 60% o más, aproximadamente 75% o más, aproximadamente 100% o más, aproximadamente 125% o más, aproximadamente 150% o más, aproximadamente 175% o más, aproximadamente 200% o más, aproximadamente 250% o más, aproximadamente 300% o más, aproximadamente 350% o más, aproximadamente 400% o más, aproximadamente 450% o más, o aproximadamente 500 % o mayor actividad en el receptor de GLP-1 en relación con el GLP-1 natural (potencia de GLP-1). En algunas realizaciones, **Q** muestra aproximadamente 5.000% o menos o aproximadamente 10.000% o menos actividad en el receptor de GLP-1 en relación con el GLP-1 natural.

40 **[0127]** En algunas realizaciones, **Q** muestra actividad (potencia) sustancial en sólo el receptor de GLP-1 y poca o ninguna actividad en el receptor de glucagón o el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** es considerado como un "agonista del receptor de GLP-1 puro" o no se considera como un "coagonista del receptor de glucagón/GLP-1" o un "coagonista de GLP-1/GIP". En algunas realizaciones, **Q** presenta cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de GLP-1 descritos en el presente documento, pero tiene sustancialmente menos actividad (potencia) en el receptor de glucagón o el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} en el receptor de glucagón que es 100 veces o mayor que la EC_{50} en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} en el receptor de GIP, que es 100 veces o mayor que la EC_{50} en el receptor de GLP-1.

Actividad en el receptor de GIP

50 **[0128]** En algunas realizaciones, **Q** presenta una EC_{50} para la activación del receptor de GIP (o una IC_{50} para el antagonismo del receptor de GIP) de aproximadamente 10 mM o menos, o aproximadamente 1 mM (1.000 μM) o menos (por ejemplo, aproximadamente 750 μM o menos, aproximadamente 500 μM o menos, aproximadamente 250 μM o menos, aproximadamente 100 μM o menos, aproximadamente 75 μM o menos, aproximadamente 50 μM o menos, aproximadamente 25 μM o menos, aproximadamente 10 μM o menos, aproximadamente 7,5 μM o menos, aproximadamente 6 μM o menos, aproximadamente 5 μM o menos, aproximadamente 4 μM o menos, aproximadamente 3 μM o menos, aproximadamente 2 μM o menos, o aproximadamente 1 μM o menos). En algunas realizaciones, la EC_{50} o IC_{50} de **Q** en el receptor de GIP es de menos de 1.000 nM, menos de 900 nM, menos de 800 nM, menos de 700 nM, menos de 600 nM, menos de 500 nM, menos de 400 nM, menos de 300 nM, o menos de 200 nM. En algunas realizaciones, la EC_{50} o IC_{50} de **Q** en el receptor de GIP es de aproximadamente 100 nM o menos, por ejemplo, aproximadamente 75 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 25 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, aproximadamente 8 nM o menos, aproximadamente 6 nM o menos, aproximadamente 5 nM o menos, aproximadamente 4 nM o menos, aproximadamente 3 nM o menos, aproximadamente 2 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} o IC_{50} para la activación del receptor de GIP que está en el intervalo picomolar. En realizaciones de ejemplo, la EC_{50} o IC_{50} de **Q** en el receptor de GIP es inferior a 1.000 pM, inferior a 900 pM, inferior a 800 pM, inferior a 700 pM, inferior a 600 pM, inferior a 500 pM, inferior a 400 pM, inferior a 300 pM, inferior a 200 pM. En algunas realizaciones,

la EC_{50} o IC_{50} de **Q** en el receptor de GIP es de aproximadamente 100 pM o menos, por ejemplo, aproximadamente 75 pM o menos, aproximadamente 50 pM o menos, aproximadamente 25 pM o menos, aproximadamente 10 pM o menos, aproximadamente 8 pM o menos, aproximadamente 6 pM o menos, aproximadamente 5 pM o menos, aproximadamente 4 pM o menos, aproximadamente 3 pM o menos, aproximadamente 2 pM o menos, o de aproximadamente 1 pM 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 de GIP, por ejemplo, mediante el ensayo de células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor y un gen de luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc, tal como se describe en el Ejemplo 2.

[0129] En algunas realizaciones de las presentes divulgaciones, **Q** muestra al menos o aproximadamente el 0,1% de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP. En realizaciones de ejemplo, **Q** muestra al menos o aproximadamente el 0,2%, al menos o aproximadamente el 0,3%, al menos o aproximadamente el 0,4%, al menos o aproximadamente el 0,5%, al menos o aproximadamente el 0,6%, al menos o aproximadamente el 0,7%, al menos o aproximadamente el 0,8%, al menos o aproximadamente el 0,9%, al menos o aproximadamente el 1%, al menos o aproximadamente el 5%, al menos o aproximadamente el 10%, al menos o aproximadamente el 20%, al menos o aproximadamente el 30%, al menos o aproximadamente el 40%, al menos o aproximadamente el 50%, al menos o aproximadamente el 60%, al menos o aproximadamente el 70%, al menos o aproximadamente el 75%, al menos o aproximadamente el 80%, al menos o aproximadamente el 90%, al menos o aproximadamente el 95%, o al menos o aproximadamente el 100% de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP.

[0130] En algunas realizaciones de las presentes divulgaciones, **Q** muestra actividad en el receptor de GIP que es mayor que la de GIP natural. En realizaciones de ejemplo, **Q** muestra al menos o aproximadamente el 101%, al menos o aproximadamente el 105%, al menos o aproximadamente el 110%, al menos o aproximadamente el 125%, al menos o aproximadamente el 150%, al menos o aproximadamente el 175%, al menos o aproximadamente el 200%, al menos o aproximadamente el 300%, al menos o aproximadamente el 400%, al menos o aproximadamente el 500% o un % superior de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** no muestra más de 1.000%, 10.000%, 100.000%, o 1.000.000% de actividad en el receptor de GIP en relación con GIP natural. La actividad de un péptido en el receptor de GIP en relación con GIP natural se calcula como la relación inversa de EC_{50} para el péptido agonista de GIP vs. GIP natural.

[0131] En algunas realizaciones, **Q** muestra actividad (potencia) sustancial en sólo el receptor de GIP y poca o ninguna actividad en el receptor de glucagón o el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, **Q** es considerado como un "agonista puro del receptor de GIP" o no se considera como una "coagonista del receptor de glucagón/GIP" o un "coagonista de GLP-1/GIP". En algunas realizaciones, **Q** presenta cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de GIP descritos en el presente documento, pero tiene sustancialmente menos actividad (potencia) en el receptor de glucagón o el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} en el receptor de glucagón que es 100 veces o mayor que la EC_{50} en el receptor de GIP y una EC_{50} en el receptor de GLP-1 que es 100 veces o mayor que la EC_{50} en el receptor de GIP.

Actividad en el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón

[0132] En algunas realizaciones, **Q** presenta actividad tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucagón ("coagonistas del receptor de glucagón/GLP-1"). En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC_{50} o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de glucagón está dentro de aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su actividad (por ejemplo, la EC_{50} o la actividad relativa o potencia) en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia de glucagón de **Q** está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de GLP-1.

[0133] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la EC_{50} o la potencia de **Q** en el receptor de glucagón dividida por la actividad relativa o la EC_{50} o potencia de **Q** en el receptor de GLP-1 es menor que, o es aproximadamente, X, donde X se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de glucagón dividida por la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 a menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucagón de **Q** comparado con la potencia de GLP-1 de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, Z, donde Z se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucagón de **Q** en comparación con la potencia de GLP-1 de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC_{50} en el receptor de glucagón, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC_{50} en el receptor de GLP-1.

[0134] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la potencia o la EC_{50} de **Q** en el receptor de GLP-1 dividida por la actividad relativa o potencia o la EC_{50} del análogo de glucagón en el receptor de glucagón es menor que, o es aproximadamente, V, donde V se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas

realizaciones, la relación de la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GLP-1 dividida por la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de glucagón es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 de **Q** comparado con la potencia de glucagón de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, *W*, donde *W* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 de **Q** en comparación con la potencia de glucagón de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC_{50} en el receptor de GLP-1, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC_{50} en el receptor de glucagón.

[0135] En algunas realizaciones, **Q** muestra al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 (potencia de GLP-1) y presenta al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón (potencia de glucagón).

[0136] La selectividad de **Q** para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1 puede ser descrito como la relación relativa de actividad de glucagón/GLP-1 (actividad de **Q** en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural, dividida por la actividad del análogo en el receptor de GLP-1 con respecto al GLP-1 natural). Por ejemplo, **Q** que muestra 60% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón y 60% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 tiene una relación 1:1 de actividad de glucagón/GLP-1. Las relaciones de ejemplo de actividad de glucagón/GLP-1 incluyen aproximadamente 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1, o aproximadamente 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, o 1:1,5. Como ejemplo, una relación de actividad de glucagón/GLP-1 de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1. Del mismo modo, una relación de actividad de GLP-1/glucagón de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón.

[0137] En algunas realizaciones, **Q** muestra actividad (potencia) sustancial en el receptor de glucagón y receptor de GLP-1 y poca o ninguna actividad en el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** presenta cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de glucagón y el receptor de GLP-1 descrito en el presente documento, pero tiene una actividad (potencia) sustancialmente menor en el receptor de GIP. En algunas realizaciones, **Q** muestra una EC_{50} en el receptor de GIP, que es 100 veces o mayor que la EC_{50} en el receptor de glucagón y la EC_{50} en el receptor de GLP-1.

Actividad en el receptor de GLP-1 y el receptor de GIP

[0138] En algunas realizaciones, **Q** presenta actividad tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de GIP ("coagonistas del receptor de GIP/GLP-1"). En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC_{50} o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de GIP está dentro de aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su actividad (por ejemplo, la EC_{50} o la actividad relativa o potencia) en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia de GIP de **Q** está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de GLP-1.

[0139] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la EC_{50} o la potencia de **Q** en el receptor de GIP dividida por la actividad relativa o la EC_{50} o potencia de **Q** en el receptor de GLP-1 es menor que, o es aproximadamente, *X*, donde *X* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GIP dividida por la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 a menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP de **Q** comparado con la potencia de GLP-1 de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, *Z*, donde *Z* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP de **Q** en comparación con la potencia de GLP-1 de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC_{50} en el receptor de GIP, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC_{50} en el receptor de GLP-1.

[0140] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la potencia o la EC_{50} de **Q** en el receptor de GLP-1 dividida por la actividad relativa o potencia o la EC_{50} de **Q** en el receptor de GIP es menor que, o es aproximadamente, *V*, donde *V* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GLP-1 dividida por la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GIP es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 de **Q** comparado con la potencia de GIP de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, *W*, donde *W* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 de **Q** en

comparación con la potencia de GIP de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC₅₀ en el receptor de GLP-1, que es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC₅₀ en el receptor de GIP.

[0141] En algunas realizaciones, **Q** muestra al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 (potencia de GLP-1) y presenta al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP (potencia de GIP).

[0142] La selectividad de **Q** para el receptor de GIP en comparación con el receptor de GLP-1 puede ser descrito como la relación relativa de actividad de GIP/GLP-1 (actividad de **Q** en el receptor de GIP en relación con el GIP natural, dividida por la actividad del análogo en el receptor de GLP-1 con respecto al GLP-1 natural). Por ejemplo, **Q** que muestra 60% de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP y 60% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 tiene una relación 1:1 de actividad de GIP/GLP-1. Las relaciones de ejemplo de actividad de GIP/GLP-1 incluyen aproximadamente 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1, o aproximadamente 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, o 1:1,5. Como ejemplo, una relación de actividad de GIP/GLP-1 de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de de GIP en comparación con el receptor de GLP-1. Del mismo modo, una relación de actividad de GLP-1/GIP de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de GIP.

Actividad en el receptor de glucagón y el receptor de GIP

[0143] En algunas realizaciones, **Q** presenta actividad tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GIP ("coagonistas del receptor de GIP/glucagón"). En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de GIP está dentro de aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, la potencia de GIP de **Q** está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de glucagón.

[0144] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la EC₅₀ o la potencia de **Q** en el receptor de GIP dividida por la actividad relativa o la EC₅₀ o potencia de **Q** en el receptor de glucagón es menor que, o es aproximadamente, X, donde X se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 a menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP de **Q** comparado con la potencia de glucagón de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, Z, donde Z se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP de **Q** en comparación con la potencia de glucagón de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC₅₀ en el receptor de GIP, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC₅₀ en el receptor de glucagón.

[0145] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la potencia o la EC₅₀ de **Q** en el receptor de glucagón dividida por la actividad relativa o potencia o la EC₅₀ de **Q** en el receptor de GIP es menor que, o es aproximadamente, V, donde V se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de glucagón dividida por la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GIP es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucagón de **Q** comparado con la potencia de GIP de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, W, donde W se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucagón de **Q** en comparación con la potencia de GIP de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC₅₀ en el receptor de glucagón, que es de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC₅₀ en el receptor de GIP.

[0146] En algunas realizaciones, **Q** muestra al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón (potencia de glucagón) y presenta al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP (potencia de GIP).

[0147] La selectividad de **Q** para el receptor de GIP en comparación con el receptor de glucagón puede ser descrito

como la relación relativa de actividad de GIP/glucagón (actividad de **Q** en el receptor de GIP en relación con el GIP natural, dividida por la actividad del análogo en el receptor de glucagón con respecto al glucagón natural). Por ejemplo, **Q** que muestra 60% de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP y 60% de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón tiene una relación 1:1 de actividad de GIP/glucagón. Las relaciones de ejemplo de actividad de GIP/glucagón incluyen aproximadamente 1:1, 1,5:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 o 10:1, o aproximadamente 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, o 1:1,5. Como ejemplo, una relación de actividad de GIP/glucagón de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de GIP en comparación con el receptor de glucagón. Del mismo modo, una relación de actividad de GLP-1/glucagón de 10:1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GIP.

Actividad en el receptor de glucagón, el receptor de GLP-1, y el receptor GIP

[0148] En algunas realizaciones, **Q** presenta actividad en los tres del receptor de glucagón, receptor de GLP-1, y el receptor de GIP ("triagonistas del receptor de glucagón/GLP-1/GIP"). En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de glucagón está dentro de aproximadamente 100 veces, aproximadamente 75 veces, aproximadamente 60 veces, 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) en el receptor de GLP-1 y el receptor de GIP. En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de GLP-1 está dentro de aproximadamente 100 veces, aproximadamente 75 veces, aproximadamente 60 veces, 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia), en el receptor de glucagón y el receptor de GIP. En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de GIP está dentro de aproximadamente 100 veces, aproximadamente 75 veces, aproximadamente 60 veces, 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de su actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia), en el receptor de glucagón y el receptor de GLP-1. Esta diferencia de veces se puede expresar alternativamente como relaciones de glucagón/GLP-1 o GLP-1/GIP, o de glucagón/GLP-1 como anteriormente.

Estructura del péptido de la superfamilia de glucagón (Q)

[0149] El péptido de la superfamilia del glucagón (Q) descrito en el presente documento puede comprender una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos del glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1601), GLP-1 humano natural (SEQ ID NOs: 1603 o 1604), o GIP humano natural (SEQ ID NO: 1607).

En base a glucagón humano natural

[0150] En algunos aspectos de la invención, el péptido de la superfamilia del glucagón (Q) comprende una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos del glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1601). En algunos aspectos, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 1601 que comprende 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. En algunas realizaciones, **Q** comprende un total de 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1601). En algunas realizaciones, las modificaciones son cualquiera de las descritas en el presente documento, por ejemplo, acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en C-terminal, la sustitución de 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.

[0151] En algunas realizaciones, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 25% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1601). En algunas realizaciones, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90 % o más de un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1601. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de **Q**, que tiene el % de identidad de secuencia anteriormente referenciada es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de **Q**. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de **Q** que tiene el % de identidad de secuencia referenciada anteriormente es sólo una parte de la secuencia de aminoácidos de **Q**. En algunas realizaciones, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos que tiene sobre un % de identidad de secuencia A o mayor con una secuencia de aminoácidos referenciada de al menos 5 aminoácidos contiguos (por ejemplo, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 aminoácidos) de la SEQ ID NO: 1601, donde la secuencia de aminoácidos de referencia comienza con el aminoácido en la posición C de la SEQ ID NO: 1601 y termina con el aminoácido en la posición D de la SEQ ID NO: 1601, en la que A es 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99; C es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 y D es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29. Cualquiera y todas las posibles combinaciones de los parámetros anteriores se contemplan, incluyendo por ejemplo, en la que A es 90% y C y D son 1 y 27, o 6 y 27, o 8 y 27, o 10 y 27, o 12 y 27, o 16 y 27.

En base a GLP-1 humano natural

5 **[0152]** En algunos aspectos de la invención, el péptido de la superfamilia del glucagón (Q) comprende una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano natural (SEQ ID NO: 1603). En algunos aspectos, Q comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 1603 que comprende 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. En algunas realizaciones, Q comprende un total de 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 modificaciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de GLP-1 humana natural (SEQ ID NO: 1603). En algunas realizaciones, las modificaciones son cualquiera de las descritas en el presente documento, por ejemplo, acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en C-terminal, la sustitución de 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.

15 **[0153]** En algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 25% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos del GLP-1 humano natural (SEQ ID NO: 1603). En algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90 % o más de un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1603. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de Q, que tiene el % de identidad de secuencia anteriormente referenciada es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de Q. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de Q que tiene el % de identidad de secuencia referenciada anteriormente es sólo una parte de la secuencia de aminoácidos de Q. En algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que tiene sobre un % de identidad de secuencia A o mayor con una secuencia de aminoácidos referenciada de al menos 5 aminoácidos contiguos (por ejemplo, al menos 6, al menos 7, al menos 8, 20 al menos 9, al menos 10 aminoácidos) de la SEQ ID NO: 1603, donde la secuencia de aminoácidos de referencia comienza con el aminoácido en la posición C de la SEQ ID NO: 1603 y termina con el aminoácido en la posición D de la SEQ ID NO: 1603, en la que A es 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99; C es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 y D es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29. Cualquiera y todas las posibles combinaciones de los parámetros anteriores se contemplan, incluyendo por ejemplo, en la que A es 90% y C y D son 1 y 27, o 6 y 27, o 8 y 27, o 10 y 27, o 12 y 27, o 16 y 27.

En base a GIP humano natural

35 **[0154]** En algunas realizaciones de las presentes divulgaciones, Q es un análogo de GIP humano natural, la secuencia de aminoácidos de la cual se proporciona en el presente documento como SEQ ID NO: 1607. Por consiguiente, en algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1607 pero está modificado con 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. En algunas realizaciones, Q comprende un total de 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 modificaciones de aminoácidos respecto a la secuencia de GIP humano natural (SEQ ID NO: 1607). En algunas realizaciones, las modificaciones son cualquiera de las descritas en el presente documento, por ejemplo, acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en C-terminal, la sustitución de 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. Los ejemplos de agonistas del receptor de GIP son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Irwin et al, J Pharm y Expmt Ther 314 (3): 1187-1194 (2005); Salhanick et al, Bioorg Med Chem Lett 15 (18): 4114-4117 (2005); Green et al, Diabetes 7 (5): 595-604 (2005); O'Harte et al, J Endocrinol 165 (3): 639-648 (2000); O'Harte et al, Diabetologia 45 (9): 1281-1291 (2002); Gault et al, Biochem J 367 (PT3): 913-920 (2002); Gault et al, J Endocrin 176: 133-141 (2003); Irwin et al., Diabetes Obes Metab. 11 (6): 603-610 (epub 2009).

50 **[0155]** En algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 25% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de GIP humana natural (SEQ ID NO: 1607). En algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90 % o tiene más de un 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1607. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de Q que tiene el % de identidad de secuencia anteriormente referenciada es la secuencia de aminoácidos de longitud completa de Q. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de Q que tiene el % de identidad de secuencia referenciada anteriormente es sólo una parte de la secuencia de aminoácidos de Q. En algunas realizaciones, Q comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un % de aproximadamente A o mayor identidad de secuencia con una secuencia de aminoácidos de referencia de al menos 5 aminoácidos contiguos (por ejemplo, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10 aminoácidos) de la SEQ ID NO: 1607, en el que la secuencia de aminoácidos de referencia comienza con el aminoácido en la posición C de la SEQ ID NO: 1607 y termina con el aminoácido en la posición D de la SEQ ID NO: 1607, en el que A es 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99; C es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, o 28 y D es 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 29. Se contemplan cualquiera y todas las posibles combinaciones de los parámetros anteriores, incluyendo por ejemplo, en

el que A es 90% y C y D son 1 y 27, o 6 y 27, o 8 y 27, o 10 y 27, o 12 y 27, o 16 y 27.

Modificaciones

5 **[0156]** Cuando **Q** es un péptido relacionado con glucagón, **Q** puede comprender la secuencia de aminoácidos de glucagón natural (SEQ ID NO: 1601) con modificaciones. En realizaciones de ejemplo, el péptido relacionado con glucagón puede comprender un total de 1, hasta 2, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta 10 modificaciones de aminoácidos relativas a la secuencia de glucagón natural, por ejemplo, sustituciones conservativas o no conservativas. Las modificaciones y sustituciones descritas en el presente documento son, en
10 ciertos aspectos, realizadas en posiciones específicas dentro de **Q** en el que la numeración de la posición corresponde a la numeración de glucagón (SEQ ID NO: 1601). En algunas otras realizaciones se llevan a cabo 1, 2, 3, 4 o 5 sustituciones no conservativas en cualquiera de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 y se llevan a cabo hasta 5 sustituciones conservativas adicionales en cualquiera de estas posiciones. En algunas otras realizaciones, se llevan a cabo 1, 2, o 3 modificaciones de aminoácidos dentro de los
15 aminoácidos en las posiciones 1-16, y se llevan a cabo 1, 2 o 3 modificaciones de aminoácidos dentro de los aminoácidos en las posiciones 17-26. En algunas realizaciones, **Q** retiene al menos 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de los aminoácidos de origen natural en las posiciones correspondientes en el glucagón natural (por ejemplo, tienen 1-7, 1-5 o 1-3 modificaciones relativas al glucagón de origen natural).

20 Resistencia a DPP-IV

[0157] En algunas realizaciones, cuando **Q** es un péptido de la superfamilia del glucagón, **Q** comprende una modificación en la posición 1 o 2 para reducir la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 1 de **Q** (por ejemplo, seleccionada de entre las de la
25 figura 1) está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido imidazol acético, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 de **Q** está sustituida con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina y aminoácidoisobutírico. En algunas realizaciones, la posición 2 del péptido relacionado con glucagón no es D-serina.

Modificación de glucagón en la posición 3

[0158] Los péptidos relacionados con glucagón de las clases 1 a 3 descritos en el presente documento pueden estar modificados en la posición 3 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) para mantener o
35 aumentar la actividad en el receptor de glucagón.

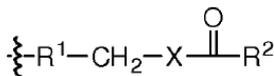
[0159] En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3, la actividad mantenida o mejorada en el receptor de glucagón puede lograrse mediante la modificación de la Gln en la posición 3 con un análogo de glutamina. Por ejemplo, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 que comprende un análogo de glutamina en la posición 3 puede mostrar aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente el 20%, aproximadamente el 50%, o aproximadamente 85% o mayor de la actividad de glucagón natural (SEQ ID NO: 1601) en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 que comprende un análogo de glutamina en la
40 posición 3 puede presentar aproximadamente el 20%, aproximadamente el 50%, aproximadamente el 75%, aproximadamente el 100%, aproximadamente el 200% o aproximadamente el 500% o mayor la actividad de un péptido de glucagón correspondiente que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido que comprende el análogo de glutamina, excepto para el aminoácido modificado en la posición 3 en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 que comprende un análogo de glutamina en la posición 3 muestra una mayor actividad en el receptor de glucagón, pero la actividad mejorada no es más de 1.000%, 10.000%, 100.000%, o 1.000.000% de la actividad del glucagón natural o de un péptido relacionado con glucagón correspondiente que tiene la misma secuencia de aminoácidos que el péptido que comprende el análogo de glutamina, excepto por el aminoácido modificado en la posición 3.

[0160] En algunas realizaciones, el análogo de glutamina es un aminoácido de origen natural o no natural que comprende una cadena lateral de la Estructura I, II o III:

60

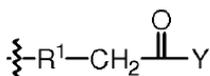
65

5



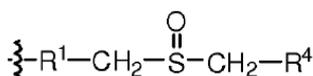
Estructura I

10



Estructura II

15



Estructura III

20

25

en las que R¹ es alquilo C₀₋₃ o heteroalquilo C₀₋₃; R² es NHR⁴ o alquilo C₁₋₃; R³ es alquilo C₁₋₃; R⁴ es H o alquilo C₁₋₃; X es NH, O, o S; e Y es NHR⁴, SR³, u OR³. En algunas realizaciones, X es 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 de ejemplo en las que Q es un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, Clase 2 o Clase 3, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de estructura I en donde, R¹ es CH₂-S, X es NH, y R² es CH₃ (acetamidometil-cisteína, C(Acm)); R¹ es CH₂, X es NH, y R² es CH₃ (ácido acetildiaminobutanoico, Dab (Ac)); R¹ es alquilo C₀, X es NH, R² es NHR⁴, y R⁴ es H (ácido carbamoildiaminopropanoico, Dap (urea)); o R¹ es CH₂-CH₂, X es NH, y R² es CH₃ (acetilornitina, Orn (Ac)). En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura II donde R¹ es CH₂, Y es NHR⁴, y R⁴ es CH₃ (metilglutamina, Q (Me)). En realizaciones de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura III donde R¹ es CH₂ y R⁴ es H (metionina-sulfóxido, M(O)); en realizaciones específicas, el aminoácido en la posición 3 está sustituido por Dab(Ac).

30

35

Acilación de Q

40

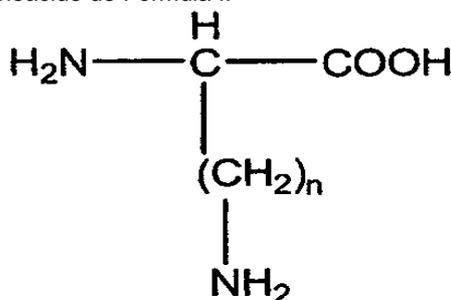
[0161] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, péptido relacionado con glucagón de Clase 2, péptido relacionado con glucagón de Clase 3, péptido relacionado con glucagón de Clase 4, péptidos relacionados con glucagón de Clase 4 o péptido relacionado con glucagón de Clase 5), Q se modifica para comprender un grupo acilo. El grupo acilo puede estar unido covalentemente directamente a un aminoácido del péptido Q, o indirectamente a un aminoácido de Q a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido de Q y el grupo acilo. Q puede estar acilado en la misma posición de aminoácido donde se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Tal como se describe en el presente documento, Q puede ser un péptido de la superfamilia del glucagón, péptido relacionado con glucagón, incluyendo un péptido relacionado con glucagón de clase 1, 2, 3, 4 o 5, o la osteocalcina, la calcitonina, la amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos. Por ejemplo, Q puede ser uno de Clase 1, Clase 2, Clase 3, Clase 4 o Clase 5, y puede comprender un grupo acilo que es un aminoácido de origen no natural a natural. La acilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro Q. Cuando Q es un péptido relacionado con glucagón, la acilación se puede producir en cualquier posición, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, siempre que la actividad mostrada por el péptido relacionado con glucagón no acilado se retenga después de la acilación. Por ejemplo, si el péptido no acilado tiene actividad agonista del glucagón, entonces el péptido acilado retiene la actividad agonista del glucagón. Por ejemplo, también, si el péptido no acilado tiene actividad antagonista del glucagón, entonces el péptido acilado retiene la actividad antagonista del glucagón. Por ejemplo, si el péptido no acilado tiene actividad agonista de GLP-1, entonces el péptido acilado retiene la actividad agonista de GLP-1. Los ejemplos no limitantes incluyen la acilación en las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, o 29 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural). Con respecto a los péptidos relacionados con glucagón de Clase 1, Clase 2 y Clase 3, la acilación se puede producir en cualquiera de las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). Otros ejemplos no limitantes con respecto a los péptidos relacionados con glucagón (por ejemplo, la clase 1, 2, 3, 4, o 5) incluyen la acilación en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del péptido de glucagón, por

65

ejemplo, la posición 24, 28 o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

[0162] En un aspecto específico de la descripción, el péptido Q (por ejemplo, un péptido de la superfamilia de glucagón, un péptido relacionado con glucagón, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, 2, 3, 4 o 5 u osteocalcina, calcitonina, amilina o un análogo, derivado o conjugado de los mismos) se modifica para que comprenda un grupo acilo por acilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido de Q. En algunas realizaciones, Q se acila directamente a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones, cuando Q es un péptido relacionado con glucagón, la acilación está en la posición 10, 20, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). A este respecto, el péptido relacionado con glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1601, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en posiciones 10, 20, 24 y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) modificado a cualquier aminoácido que comprenda una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral. En un aspecto específico de la descripción, cuando Q es un péptido relacionado con glucagón, la acilación directa de Q tiene lugar a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral del aminoácido en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural).

[0163] En algunas realizaciones, el aminoácido del péptido Q (por ejemplo, un péptido de la superfamilia del glucagón, un péptido relacionado con glucagón, un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 o 5, o la osteocalcina, la calcitonina, la amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos) que comprende una amina de la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula I:

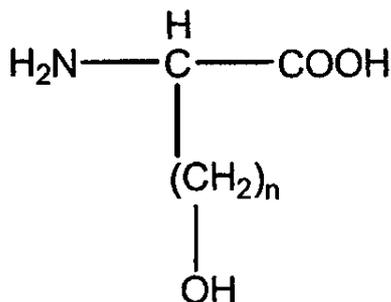


en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula I]

En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula I, es el aminoácido en el que n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

[0164] En otras realizaciones, el aminoácido de péptido Q que comprende un grupo hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula II:



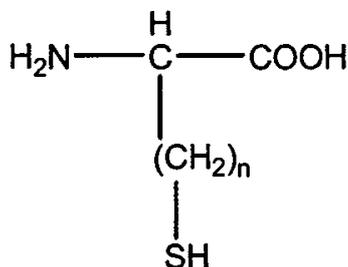
en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula II]

En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Ser).

[0165] En aún otras realizaciones, el aminoácido de péptido Q que comprende un tiol en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula III:

65



en la que $n = 1$ a 4
[Fórmula III]

En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Cys).

[0166] En otras realizaciones, el aminoácido de péptido **Q** que comprende una cadena lateral de amina, hidroxilo o tiol es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de fórmula I, fórmula II o fórmula III, excepto que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de fórmula I, fórmula II o fórmula III está sustituido por una segunda cadena lateral.

[0167] En algunas realizaciones de la descripción, el péptido **Q** acilado (por ejemplo, un péptido de la superfamilia del glucagón, un péptido relacionado con glucagón, un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, 2, 3, 4 o 5, o la osteocalcina, la calcitonina, la amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos) comprende un espaciador entre el péptido y el grupo acilo. En algunas realizaciones, **Q** está unido covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo acilo. En algunas realizaciones de ejemplo, **Q** está modificado para comprender un grupo acilo mediante acilación de una amina, hidroxilo o tiol de un espaciador, cuyo espaciador (donde **Q** es un péptido relacionado con glucagón, por ejemplo, de la clase 1, 2, 3, 4 o 5) está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24, o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), o en el aminoácido C-terminal del péptido relacionado con glucagón. El aminoácido del péptido **Q** al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprende un resto que permite la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende una cadena lateral $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, o $-\text{COOH}$ (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. Un aminoácido del péptido **Q** (por ejemplo, un aminoácido α -sustituido de forma individual o doble) que comprende una cadena lateral con $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, o $-\text{COOH}$ (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) también es adecuado. En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, de la clase 1, 2, 3, 4 o 5), el péptido relacionado con glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1601, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) modificado por cualquier aminoácido que comprende una cadena lateral con amina, hidroxilo o carboxilato.

[0168] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido **Q** y el grupo acilo es un aminoácido que comprende una cadena lateral con amina, hidroxilo o tiol, o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una cadena lateral con amina, hidroxilo, o tiol. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos no es γ -Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es γ -Glu- γ -Glu.

[0169] Cuando la acilación se produce a través de un grupo amina del aminoácido del espaciador, la acilación puede tener lugar a través de la amina alfa del aminoácido o una amina de la cadena lateral. En el caso en el que se acila la amina alfa, el aminoácido del espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido del espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. En algunas realizaciones, el aminoácido espaciador puede ser, por ejemplo, un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico. Alternativamente, el aminoácido del espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu. En el caso en el que se acila la amina de la cadena lateral del aminoácido del espaciador, el aminoácido del espaciador es un aminoácido que comprende una amina en la cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula I (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible acilar la amina alfa y la amina de la cadena lateral del aminoácido del espaciador, de manera que el péptido se diacila. Las realizaciones de la descripción incluyen tales moléculas diaciladas.

[0170] Cuando la acilación se produce a través de un grupo hidroxilo del aminoácido del espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula II. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Ser.

[0171] Cuando la acilación se produce a través de un grupo tiol del aminoácido del espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de Fórmula III. En una realización de ejemplo específica, el aminoácido es Cys.

[0172] En algunas realizaciones, el espaciador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli(alquilo)carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, en el que 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 de Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

[0173] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido **Q** y el grupo acilo comprende un espaciador bifuncional hidrófobo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato.

[0174] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido **Q** y el grupo acilo es un espaciador bifuncional hidrófobo. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, GT Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996). En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un carboxilato, y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxi octanoico y ácido 8-mercapto octanoico.

[0175] En algunas realizaciones, el espaciador bifuncional no es un ácido dicarboxílico que comprende un metileno no ramificado de 1-7 átomos de carbono entre los grupos carboxilato. En algunas realizaciones, el espaciador bifuncional es un ácido dicarboxílico que comprende un metileno no ramificado de 1-7 átomos de carbono entre los grupos carboxilato.

[0176] El espaciador (por ejemplo, aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrófilo, o espaciador bifuncional hidrófobo) en realizaciones específicas, en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, de 6 a 10 átomos, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, el espaciador tiene de aproximadamente 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo acilo es un grupo acilo graso C_{12} a C_{18} , por ejemplo, un grupo acilo graso C_{14} , un grupo acilo graso C_{16} , de manera que la longitud total del espaciador y grupo acilo 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, en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, la longitud del espaciador y grupo acilo es de 17 a 28 (por ejemplo, 19 a 26, 19 a 21) átomos.

[0177] Según ciertas realizaciones, en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen natural (incluyendo cualquiera de los descritos en el presente documento) que comprende una cadena principal de aminoácido que tiene de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-amino valérico, ácido 7-amino heptanoico, y ácido 8-amino octanoico). Alternativamente, el espaciador unido al péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3 puede ser un espaciador dipéptido o tripéptido que tiene una cadena principal peptídica que tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, 6 a 10 átomos) de longitud. Cada aminoácido del espaciador dipéptido o tripéptido unido al péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3 puede ser el mismo o diferente de otro aminoácido o aminoácidos del dipéptido o tripéptido y puede seleccionarse independientemente entre el grupo que consiste en: aminoácidos de origen natural y/o de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los isómeros **D** o **L** de los aminoácidos de origen natural (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 de origen no natural seleccionados del grupo constituido por: β -alanina (β -Ala), $\text{N-}\alpha$ -metil alanina (Me-Ala), aminoácido butírico (Abu), ácido γ -aminobutírico (γ -Abu), aminoácido hexanoico (ϵ -Ahx), aminoácido isobutírico (Aib), aminoácido metilpirrolcarboxílico, aminoácido piperidincarboxílico, aminoserina (Ams), aminoácido tetrahidropirano-4- carboxílico, arginina N -metoxi- N -metil amida, ácido β -aspártico (β -Asp), ácido azetidín-carboxílico, 3-(2-benzotiazolil) alanina, α -terc-butilglicina, ácido 2-amino-5-ureido- n -valérico (citrulina, Cit), β -Ciclohexilalanina (Cha), acetamidometilo-cisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilalanina (DOPA), dimetil-tiazolidina (DMTA), ácido γ -glutámico (γ -Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina (Hyp), isoleucina N -metoxi- N -metil amida, 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), piperidinilalanina, piperidinilglicina, 3,4-deshidroprolina, pirrolidinilalanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), O-bencil-fosfoserina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Sta), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilalanina (Thi), O-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O-(bis-dimetilamino-fosfono)-tirosina, tirosina sulfato tetrabutilamina, metil-valina (MeVal), ácido 1-amino-1-ciclohexano ácido carboxílico (Acx), aminoácidovalérico, beta-ciclopropil-alanina (CPA), propargilglicina (Prg), alilglicina (Alg), ácido 2-amino-2-ciclohexil-propanoico (2-Cha), terc-butilglicina (TBG), vinilglicina (Vg), ácido 1-amino-1-ciclopropano carboxílico (ACP), ácido 1-amino-1-ciclopentano carboxílico (Acpe), ácido 3-mercaptopropiónico alquilado, ácido 1-amino-1-ciclobutano carboxílico (Acb).

[0178] En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, el espaciador comprende una carga global negativa, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, el dipéptido no es ninguno de los dipéptidos de estructura general A-B, en la que A se selecciona del grupo que consiste en Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe y Pro, en la que B se selecciona del grupo que consiste en Lys, His, Trp. En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, clase 2 o clase 3, 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.

[179] El péptido **Q** se puede modificar para comprender un grupo acilo mediante acilación de un alcano de cadena larga. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol, y hexadecanotiol) que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del péptido **Q**. El grupo carboxilo, o forma activada del mismo, de **Q** puede ser parte de una cadena lateral de un aminoácido (por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico) de **Q** o puede ser parte de la cadena principal del péptido.

[0180] En ciertas realizaciones, el péptido **Q** se modifica para comprender un grupo acilo por acilación de un alcano de cadena larga por un separador que se une a **Q**. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol que reacciona con un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, del espaciador. Los espaciadores adecuados que comprenden un grupo carboxilo, o forma activada del mismo, se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, espaciadores bifuncionales, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos.

[0181] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "forma activada de un grupo carboxilo" se refiere a un grupo carboxilo con la fórmula general R(C=O)X, en donde X es un grupo saliente y R es **Q** o el espaciador. Por ejemplo, las formas activadas de un grupo carboxilo pueden incluir cloruros de acilo, anhídridos, y ésteres. En algunas realizaciones, el grupo carboxilo activado es un éster con un éster de N-hidroxisuccinimida (NHS) como grupo saliente.

[0182] Con respecto a estos aspectos de la descripción, en los que se acila un alcano de cadena larga por el péptido **Q** 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 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 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, alcano C₁₆, o un alcano C₁₈.

[0183] En algunas realizaciones, se acila una amina, hidroxilo, o grupo tiol de **Q** con un ácido colesterol. En una realización específica, el péptido está unido con el ácido colesterol a través de un espaciador de des-amino Cys alquilado, es decir, un espaciador de ácido 3-mercaptopropiónico alquilado

[0184] Los procedimientos adecuados de acilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos, y tioles son conocidos en la técnica. 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 los procedimientos de acilación a través de un tiol); *Bioconjugate Chem.*: "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" páginas 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., *Pharmaceutical Res.* "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 págs.171-176 (1989).

[0185] El grupo acilo del péptido **Q** acilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones específicas de la descripción, el grupo acilo es un ácido graso de C₄ a C₃₀. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de un ácido graso C₄, ácido graso C₆, ácido graso C₈, ácido graso C₁₀, ácidos grasos C₁₂, ácido graso C₁₄, ácido graso C₁₆, ácido graso C₁₈,

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.

5 **[0186]** 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.

10 **[0187]** Los péptidos **Q** acilados descritos en este documento se pueden modificar adicionalmente para comprender un grupo hidrófilo. En algunas realizaciones específicas, el grupo hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un grupo hidrófilo se puede realizar a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas realizaciones relacionadas con péptidos relacionados con glucagón de las clases 1, 2, 3, 4 o 5, el péptido relacionado con glucagón acilado puede comprender la SEQ ID NO: 1601, incluyendo cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) comprenden un grupo acilo y al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24, ó 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, se modifican a una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un grupo hidrófilo (por ejemplo, PEG). En algunas realizaciones relacionadas con péptidos relacionados con glucagón de las clases 1, 2, 3, 4 o 5, el grupo acilo está unido a la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), opcionalmente a través de un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y el grupo hidrófilo se incorpora en un residuo de Cys en la posición 24.

25 **[0188]** Alternativamente, el péptido (**Q**) acilado puede comprender un espaciador, en el que el espaciador está acilado y modificado para comprender el grupo hidrófilo. Los ejemplos no limitantes de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, y Ac-Phe.

30 *Alquilación de Q*

[0189] En algunas realizaciones, **Q** se modifica para comprender un grupo alquilo. El grupo alquilo puede estar unido covalentemente directamente a un aminoácido del péptido **Q**, o indirectamente a un aminoácido de **Q** a través de un espaciador, en el que el espaciador se coloca entre el aminoácido de **Q** y el grupo alquilo. El grupo alquilo puede estar unido a **Q** a través de un enlace éter, tioéter, o amino, por ejemplo. **Q** puede alquilarse en la misma posición de aminoácido donde se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente. Como se describe en el presente documento, **Q** puede ser un péptido de la superfamilia del glucagón, péptido relacionado con glucagón, incluyendo un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, 2, 3, 4 o 5, o osteocalcina, calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos. Por ejemplo, **Q** puede ser un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3, y puede comprender un grupo alquilo, que es no natural a un aminoácido de origen natural.

45 **[0190]** La alquilación puede llevarse a cabo en cualquier posición dentro de **Q**. Cuando **Q** es un péptido relacionado con glucagón, la alquilación puede tener lugar en cualquier posición, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o en el aminoácido C-terminal, siempre que se mantenga una actividad agonista del péptido no alquilado con respecto al receptor de glucagón, GLP-1, GIP u otro receptor de péptido relacionado con glucagón tras la alquilación. En algunas realizaciones, si el péptido no alquilado tiene actividad agonista de glucagón, entonces el péptido alquilado retiene la actividad agonista del glucagón. En algunas realizaciones, si el péptido no alquilado tiene actividad agonista de GLP-1, entonces el péptido alquilado retiene la actividad agonista de GLP-1. Ejemplos no limitativos incluyen la alquilación en las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, o 29 (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural). Con respecto a los péptidos relacionados con glucagón de Clase 1, Clase 2 y Clase 3, la alquilación puede tener lugar en las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). Otros ejemplos no limitantes con respecto a péptidos relacionados con glucagón (por ejemplo, Clase, 1, 2, 3, 4 o 5) incluyen alquilación en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) y pegilación en una o más posiciones en la parte C-terminal del péptido relacionado con glucagón, por ejemplo, la posición 24, 28 o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), dentro de una extensión C-terminal, o en el extremo C-terminal (por ejemplo, a través de la adición de una Cys C-terminal).

60 **[0191]** En un aspecto específico de la descripción, el péptido **Q** (por ejemplo, un péptido de la superfamilia del glucagón, un péptido relacionado con glucagón, un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 o 5, o la osteocalcina, la calcitonina, la amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos) se modifica para comprender un grupo alquilo por alquilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido de **Q**. En algunas realizaciones, **Q** es directamente alquilado a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral de un aminoácido. En algunas realizaciones, cuando **Q** es un péptido relacionado con glucagón, la

alquilación es en la posición 10, 20, 24, o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). En este sentido, el péptido relacionado con glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1601, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol e la cadena lateral. En algunas realizaciones específicas de la descripción, cuando **Q** es un péptido relacionado con glucagón, la alquilación directa de **Q** se produce a través de la amina, hidroxilo o tiol den la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural).

[0192] En algunas realizaciones, el aminoácido del péptido **Q** (por ejemplo, un péptido de la superfamilia del glucagón, un péptido relacionado con glucagón, un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 ó 5, o la osteocalcina, la calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos) que comprende una amina en la cadena lateral es un aminoácido de Fórmula I. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula I, es el aminoácido en el que n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

[0193] En otras realizaciones, el aminoácido del péptido **Q** que comprende un grupo hidroxilo en la cadena lateral es un aminoácido de fórmula II. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Ser).

[0194] En otras realizaciones, el aminoácido del péptido **Q** comprende un tiol en la cadena lateral es un aminoácido de fórmula III. En algunas realizaciones de ejemplo, el aminoácido de Fórmula II es el aminoácido en el que n es 1 (Cys).

[0195] En otras realizaciones, el aminoácido del péptido **Q** que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de la Fórmula I, Fórmula II, o Fórmula III, excepto que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de fórmula I, fórmula II, o fórmula III se sustituye por una segunda cadena lateral.

[0196] En algunas realizaciones de la descripción, el péptido **Q** alquilado (por ejemplo, un péptido de la superfamilia del glucagón, un péptido relacionado con glucagón, un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 ó 5, o la osteocalcina, la calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos) comprende un espaciador entre el péptido y el grupo alquilo. En algunas realizaciones, **Q** se une covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo alquilo. En algunas realizaciones de ejemplo, el péptido **Q** se modifica para comprender un grupo alquilo por alquilación de una amina, hidroxilo o tiol de un espaciador, cuyo espaciador (donde **Q** es un péptido relacionado con glucagón, por ejemplo, de la clase 1, 2, 3, 4 o 5) está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24, o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) de **Q**. El aminoácido del péptido **Q** al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprende un resto que permite la unión con el espaciador. El aminoácido del péptido **Q** al que se une el espaciador puede ser cualquier aminoácido (por ejemplo, un aminoácido alfa-sustituido de forma individual o un aminoácido alfa, alfa-disustituido) que comprende un resto que permite la unión con el espaciador. Un aminoácido del péptido **Q** que comprende $-NH_2$, $-OH$, o $-COOH$ en la cadena lateral (por ejemplo, Lys, Orn, Ser, Asp, o Glu) es adecuado. En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, de la clase 1, 2, 3, 4 o 5), el **Q** alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1601, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende uno o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, con al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) modificado a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato en la cadena lateral.

[0197] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido **Q** y el grupo alquilo es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol en la cadena lateral. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos no es γ -Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es γ -Glu- γ -Glu.

[0198] Cuando la alquilación se produce a través de un grupo amina del aminoácido del espaciador, la alquilación puede tener lugar a través de la amina alfa del aminoácido o una amina de la cadena lateral. En el caso en el que la amina alfa está alquilada, el aminoácido del espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido del espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr. Alternativamente, el aminoácido del espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu. En realizaciones de ejemplo, el aminoácido del espaciador puede ser un aminoácido hidrófobo, por ejemplo, Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, ácido 8-aminooctanoico. Alternativamente, el aminoácido del espaciador puede ser un residuo ácido, por ejemplo, Asp y Glu, a condición de que la alquilación se produzca en la amina alfa del residuo ácido. En el caso en el que la amina de la cadena lateral del aminoácido del espaciador está alquilada, el aminoácido del espaciador es un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, por ejemplo, un aminoácido de fórmula I (por ejemplo, Lys u Orn). En este caso, es posible alquilar la amina alfa como la amina de la cadena lateral del aminoácido del espaciador, de manera

que el péptido está dialquilado. La divulgación incluye tales moléculas dialquiladas.

[0199] Cuando la alquilación se produce a través de un grupo hidroxilo del aminoácido del espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del espaciador puede ser un aminoácido de fórmula II. En un ejemplo de realización específico, el aminoácido es Ser.

[0200] Cuando la alquilación se produce a través de un grupo tiol del aminoácido del espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del espaciador puede ser un aminoácido de fórmula III. En un ejemplo de realización específico, el aminoácido es Cys.

[0201] En algunas realizaciones, el separador comprende un espaciador bifuncional hidrófilo. En una realización específica, el espaciador comprende un amino poli(alquilo)carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, en el que 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 de Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

[0202] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido **Q** y el grupo alquilo es un espaciador bifuncional hidrófilo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófilo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas 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.

[0203] En algunas realizaciones, el espaciador entre el péptido **Q** y el grupo alquilo es un espaciador bifuncional hidrófobo. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende dos o más grupos reactivos, por ejemplo, una amina, un hidroxilo, un tiol, y un grupo carboxilo o cualquiera de sus combinaciones. En ciertas realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras realizaciones, el espaciador bifuncional hidrófobo comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrófobos adecuados que comprenden un carboxilato y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxiocetanoico y ácido 8-mercaptoocetanoico.

[0204] El espaciador (por ejemplo, un aminoácido, dipéptido, tripéptido, el espaciador bifuncional hidrófilo, o el espaciador bifuncional hidrófobo) en otras realizaciones específicas en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, de 6 a 10 átomos, (por ejemplo, 6, 7, 8, 9, o 10 átomos)) de longitud. En realizaciones más específicas, el espaciador unido al péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 tiene de 3 a 10 átomos (por ejemplo, de 6 a 10 átomos) de longitud y el alquilo es un grupo alquilo de C_{12} a C_{18} , por ejemplo, un grupo alquilo C_{14} , un grupo alquilo C_{16} , de manera que la longitud total del grupo espaciador y 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 en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2 o Clase 3, la longitud del espaciador y alquilo es de 17 a 28 (por ejemplo, de 19 a 26, 19 a 21) átomos.

[0205] Según ciertas otras realizaciones anteriores en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de clase 1, clase 2, o clase 3, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen no natural que comprende una cadena principal de aminoácidos que es de 3 a 10 átomos de longitud (por ejemplo, ácido 6-aminohexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminoocetanoico). Alternativamente, el espaciador unido al péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 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 espaciador dipéptido o tripéptido unido al péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3 puede estar compuesto de aminoácidos de origen natural y/o de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos enseñados en el presente documento. En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2 o Clase 3, el espaciador comprende una carga global negativa, por ejemplo, comprende uno o dos aminoácidos cargados negativamente. En algunas realizaciones en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2 o Clase 3, 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 algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es γ -Glu- γ -Glu.

[0206] Los procedimientos adecuados de alquilación de péptidos a través de aminas, hidroxilos y tioles son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar una síntesis de éter de Williamson para formar un enlace éter entre el péptido relacionado con glucagón y el grupo alquilo. Además, una reacción de sustitución nucleófila del péptido con un haluro de alquilo puede dar lugar a cualquiera de un enlace éter, tioéter, o amino.

[0207] El grupo alquilo del péptido **Q** alquilado puede ser de cualquier tamaño, por ejemplo, cualquier longitud de cadena de carbono, y puede ser lineal o ramificado. En algunas realizaciones de la descripción, el grupo alquilo es un alquilo C_4 a C_{30} . Por ejemplo, el grupo alquilo puede ser cualquiera de un grupo alquilo C_4 , alquilo C_6 , alquilo

C8, alquilo C10, alquilo C12, alquilo C14, alquilo C16, alquilo C18, alquilo C20, alquilo C22, alquilo C24, alquilo C26, alquilo C28 o alquilo C30. En algunas realizaciones, el grupo alquilo es un alquilo C8 a C20, por ejemplo, un alquilo C14 o un alquilo C16.

5 **[0208]** 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 ácido colesterol.

10 **[0209]** En algunas realizaciones de la descripción, el péptido **Q** se modifica para comprender un grupo alquilo por reacción de un alcano de cadena larga nucleófilo con **Q**, en el que **Q** comprende un grupo saliente adecuado para la sustitución nucleófila. En aspectos específicos, el grupo nucleófilo del alcano de cadena larga comprende una amina, hidroxilo o tiol (por ejemplo, octadecilamina, tetradecanol, y hexadecanotiol). El grupo saliente de **Q** puede ser parte de una cadena lateral de un aminoácido o puede ser parte de la cadena principal del péptido. Los grupos salientes adecuados incluyen, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, halógenos, y sulfonato.

15 **[0210]** En ciertas realizaciones, el péptido **Q** se modifica para comprender un grupo alquilo haciendo reaccionar el alcano de cadena larga nucleófilo con un espaciador, que está unido a **Q**, en el que el espaciador comprende el grupo saliente. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo, o tiol. En ciertas realizaciones, el espaciador que comprende el grupo saliente puede ser cualquier espaciador discutido en el presente documento, por ejemplo, aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrófilos y espaciadores bifuncionales hidrófobos, que comprenden además un grupo saliente adecuado.

20 **[0211]** Con respecto a estos aspectos de la divulgación en el que un alcano de cadena larga es alquilado por el péptido **Q** 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 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 C24, alcano C26, alcano C28 o un alcano C30. En algunas realizaciones en las que el péptido relacionado con eglucagón es un péptido relacionado con glucagón de Clase 1, Clase 2, o Clase 3, el alcano de cadena larga comprende un alcano C8 a C20 alcano, por ejemplo, un alcano C14, un alcano C16 o un alcano C18.

25 **[0212]** Además, en algunas realizaciones, puede tener lugar la alquilación entre **Q** 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 peptídico colesterol-glucagón.

35 **[0213]** Los péptidos (**Q**) alquilados descritos en el presente documento pueden modificarse adicionalmente para comprender un resto hidrófilo. En algunas otras realizaciones específicas, el resto hidrófilo puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un resto hidrófilo se puede lograr a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los procedimientos descritos en el presente documento. En algunas otras realizaciones relacionadas con los péptidos relacionados con glucagón de clase 1, 2, 3, 4 o 5, el **Q** alquilado puede comprender SEQ ID NO: 1601, o una secuencia de aminoácidos modificada de la misma que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento, en la que al menos uno de los aminoácidos en la posición 10, 20, 24, y 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) comprenden un grupo alquilo y al menos uno de los aminoácidos en la posición 16, 17, 21, 24 y 29, una posición dentro de una extensión C-terminal o el aminoácido C-terminal se modifican a una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unido covalentemente a un resto hidrófilo (por ejemplo, PEG). En algunas otras realizaciones relacionadas con péptidos relacionados con glucagón de la clase 1, 2, 3, 4 o 5, el grupo alquilo está unido a la posición 10 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), opcionalmente a través de un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y el resto hidrófilo se incorpora en un residuo de Cys en la posición 24.

40 **[0214]** Alternativamente, el péptido **Q** alquilado puede comprender un espaciador, en el que el espaciador está alquilado y modificado para comprender el resto hidrófilo. Ejemplos no limitantes de separadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys, y Ac-Phe.

Estabilización de la estructura de hélice alfa

45 **[0215]** En algunas realizaciones, se forma un puente intramolecular entre dos cadenas laterales de aminoácidos para estabilizar la estructura tridimensional de la parte carboxi terminal (por ejemplo, los aminoácidos 12-29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural)) del péptido relacionado con glucagón **Q** de la clase 1, 2, 3, 4, o 5. Las dos cadenas laterales de aminoácidos se pueden unir entre sí a través de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, tales como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes.

50 **[0216]** En algunas realizaciones, se forma el puente intramolecular entre dos aminoácidos que están 3 aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$, en donde i es cualquier número entero entre 12 y 25

(por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25). Más particularmente, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24 o 24 y 28 (pares de aminoácidos en los que $i = 12, 16, 20, \text{ o } 24$), según la numeración del aminoácido del glucagón de tipo natural están unidos entre sí y por lo tanto estabilizan la hélice alfa de glucagón. Alternativamente, i puede ser 17.

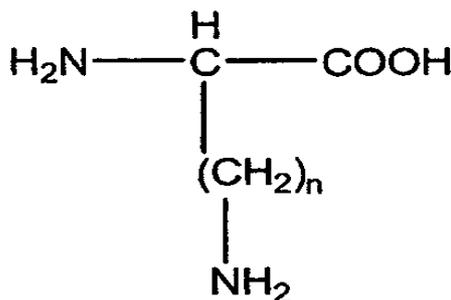
5 **[0217]** En algunas realizaciones específicas, en las que los aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$ están unidas por un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 8 átomos, o aproximadamente 7-9 átomos.

10 **[0218]** En otras realizaciones, se forma el puente intramolecular entre los dos aminoácidos que están dos aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones j y $j + 3$, en el que j es cualquier número entero entre 12 y 26 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 y 26), según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural. En algunas realizaciones específicas, j es 17.

15 **[0219]** En algunas realizaciones específicas, en las que los aminoácidos en las posiciones j y $j + 3$ están unidos por un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de aproximadamente 6 átomos, o aproximadamente 5 a 7 átomos.

20 **[0220]** En otras realizaciones, se forma el puente intramolecular entre dos aminoácidos que están 6 aminoácidos separados, por ejemplo, aminoácidos en las posiciones k y $k + 7$, en el que k es cualquier número entero entre 12 y 22 (por ejemplo, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, y 22), según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural. En algunas realizaciones específicas, k es 12, 13, o 17. En una realización de ejemplo, k es 17.

25 **[0221]** Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente de unión de seis átomos incluyen Orn y Asp, Glu y un aminoácido de la Fórmula I, en la que n es 2, y ácido homoglutámico y un aminoácido de la Fórmula I, en la que n es 1, en el que la Fórmula I es:



40 en la que $n = 1$ a 4

[Fórmula I]

45 **[0222]** Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente de unión que tiene siete átomos incluyen Orn-Glu (lactama); Lys-Asp (lactama); o Homoser-Homoglu (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de ocho átomos incluyen Lys-Glu (lactama); Homolys-Asp (lactama); Orn-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe- Asp (lactama); o Tyr-Asp (lactona). Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de nueve átomos incluyen Homolys-Glu (lactama); Lys-Homoglu (lactama); 4-aminoPhe-Glu (lactama); o Tyr-Glu (lactona). Cualquiera de las cadenas laterales de estos aminoácidos puede estar sustituida con grupos químicos adicionales, siempre y cuando la estructura tridimensional de la hélice alfa no se interrumpa. Un experto en la técnica puede imaginar emparejamientos alternativos o análogos de aminoácidos alternativos, incluyendo derivados modificados químicamente que crearían una estructura estabilizadora de tamaño similar y efecto deseado. Por ejemplo, un puente disulfuro homocisteína-homocisteína tiene 6 átomos de longitud y puede ser modificado adicionalmente para proporcionar el efecto deseado. Incluso sin enlace covalente, los emparejamientos de aminoácidos descritos anteriormente o emparejamientos similares que un experto en la técnica puede imaginar también pueden proporcionar estabilidad añadida a la hélice alfa a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, mediante la formación de puentes salinos o interacciones de puentes de hidrógeno.

60

65 **[0223]** El tamaño de un anillo de lactama puede variar dependiendo de la longitud de las cadenas laterales de los aminoácidos, y en algunas realizaciones, la lactama se forma mediante la unión de las cadenas laterales de un aminoácido de lisian a una cadena lateral de ácido glutámico. Otras realizaciones de ejemplo (según la numeración de aminoácidos de glucagón de tipo natural) incluyen las siguientes parejas, opcionalmente con un puente de lactama: Glu en la posición 12 con Lys en la posición 16; Lys nativa en la posición 12 con Glu en la posición 16; Glu

en la posición 16 con Lys en la posición 20; Lys en la posición 16 con Glu en la posición 20; Glu en la posición 20 con Lys en la posición 24; Lys en la posición 20 con Glu en la posición 24; Glu en la posición 24 con Lys en la posición 28; Lys en la posición 24 con Glu en la posición 28. Alternativamente, el orden del enlace amida en el anillo de lactama se puede invertir (por ejemplo, un anillo de lactama se puede formar entre las cadenas laterales de una Lys12 y un Glu16 o alternativamente, entre un Glu12 y una Lys16).

[0224] Se pueden utilizar puentes intramoleculares distintos de un puente de lactama para estabilizar la hélice alfa de **Q**. En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente hidrófobo. En este caso, el puente intramolecular es opcionalmente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que son parte de la cara hidrofóbica de la hélice alfa de **Q**. Por ejemplo, uno de los aminoácidos unidos por el puente hidrófobo puede ser el aminoácido en la posición 10, 14, y 18 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural).

[0225] En un aspecto específico, la metátesis de olefinas se utiliza para reticular uno o dos giros de la hélice alfa de **Q** utilizando un sistema de reticulación de todos los hidrocarburos. **Q** en este caso puede comprender aminoácidos α -metilados que llevan cadenas laterales olefínicas de longitud variable y configuradas con estereoquímica R o S, en las posiciones i e $i + 4$ o $i + 7$. Por ejemplo, la cara olefínica puede comprender $(CH_2)_n$, donde n es cualquier número entero entre 1 a 6. En algunas realizaciones, n es 3 para una longitud de reticulación de 8 átomos. Los procedimientos adecuados para la formación de tales puentes intramoleculares se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000) y Walensky et al., *Science* 305: 1466-70 (2004). Alternativamente, **Q** puede comprender residuos de Ser O-alilo localizados en los giros helicoidales adyacentes, que están puenteados entre sí a través de metátesis de cierre de anillo catalizada por rutenio. Tales procedimientos de reticulación se describen en, por ejemplo, Blackwell et al., *Angew. Chem., Int. Ed.* 37: 3281- 3284 (1998).

[0226] En otro aspecto específico, el aminoácido tiodialanina no natural, lantionina, que ha sido ampliamente adoptado como un peptidomimético de cistina, se utiliza para reticular un giro de la hélice alfa. Los procedimientos adecuados de ciclación a base de lantionina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Matteucci et al., *Tetrahedron Letters* 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., *J. Peptide Res.* 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., *J. Med. Chem.* 35: 4185-4194 (1992); Osapay et al., *J. Med. Chem.* 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., *J. Org. Chem.* 36: 73-80 (1971); Goodman y Shao, *Pure Appl. Chem.* 68: 1303-1308 (1996); y Osapay y Goodman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600 (1993).

[0227] En algunas realizaciones, grupos enlazadores de α,ω -diaminoalcanos, por ejemplo, 1,4-diaminopropano y 1,5-diaminopentano) entre dos residuos de Glu en las posiciones i e $i + 7$ se utilizan para estabilizar la hélice alfa de **Q**. Dichos grupos enlazadores conducen a la formación de un puente de 9 átomos de longitud o más, dependiendo de la longitud del grupo de enlazadores de diaminoalcano. Los procedimientos adecuados para la producción de péptidos reticulados con dichos grupos enlazadores se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Phelan et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119: 455-460 (1997).

[0228] En otra realización de la descripción, se utiliza un puente disulfuro para reticular uno o dos giros de la hélice alfa de **Q**. Alternativamente, se utiliza un puente disulfuro modificado en el que uno o ambos átomos de azufre se sustituyen por un grupo metileno que da lugar a una macrociclación isostérica para estabilizar la hélice alfa de **Q**. Los procedimientos adecuados para la modificación de péptidos con puentes disulfuro o ciclación a base de azufre se describen en, por ejemplo, Jackson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 9391-9392 (1991) y Rudinger y Jost, *Experientia* 20: 570-571 (1964).

[0229] En aún otra realización, la hélice alfa de **Q** se estabiliza a través de la unión del átomo de metal por dos residuos de His o un par His y Cys posicionados en i y $i + 4$. El átomo de metal puede ser, por ejemplo, Ru (III), Cu (II), Zn (II), o Cd (II). Tales procedimientos de estabilización de hélice alfa a base de unión del metal son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Andrews y Tabor, *Tetrahedron* 55: 11711-11743 (1999); Ghadiri et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1630-1632 (1990); y Ghadiri et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9063- 9064 (1997).

[0230] La hélice alfa de **Q** alternativamente puede estabilizarse a través de otros medios de ciclación del péptido, cuyos medios se revisan en Davies, *J. Peptide. Sci* 9: 471-501 (2003). La hélice alfa puede estabilizarse a través de la formación de un puente de amida, puente de tioéter, puente de tioéster, puente de urea, puente de carbamato, puente de sulfonamida, y similares. Por ejemplo, un puente de tioéster se puede formar entre el extremo C-terminal y la cadena lateral de un residuo de Cys. Alternativamente, un tioéster se puede formar a través de cadenas laterales de aminoácidos que tienen un tiol (Cys) y un ácido carboxílico (por ejemplo, Asp, Glu). En otro procedimiento, un agente de reticulación, tal como un ácido dicarboxílico, por ejemplo, ácido subérico (ácido octanodioico), etc. puede introducir un enlace entre dos grupos funcionales de una cadena lateral de aminoácido, tal como un amino libre, hidroxilo, grupo tiol, y combinaciones de los mismos.

[0231] Según algunas realizaciones, la hélice alfa de **Q** se estabiliza mediante la incorporación de aminoácidos hidrófobos en las posiciones i e $i + 4$. Por ejemplo, i puede ser Tyr e $i + 4$ puede ser Val o Leu; i puede ser Phe e $i + 4$ puede ser Cys o Met; i puede ser Cys e $i + 4$ puede ser Met; o i puede ser Phe e $i + 4$ puede ser Ile. Debe entenderse que, para los propósitos del presente documento, los emparejamientos de los aminoácidos anteriores se

pueden invertir, de manera que el aminoácido indicado en la posición i , alternativamente, podría estar situado en $i + 4$, mientras que el aminoácido $i + 4$ puede estar situado en la posición i .

[0232] Según otras realizaciones de la descripción, en las que **Q** es un péptido relacionado con glucagón, la hélice alfa se estabiliza a través de la incorporación (ya sea por sustitución o inserción de aminoácidos) de uno o más aminoácidos estabilizantes de la hélice alfa en la parte C-terminal de **Q** (aproximadamente los aminoácidos 12-29 según la numeración de la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural). En una realización específica, el aminoácido estabilizante de la hélice alfa es un aminoácido α,α -disustituido, incluyendo cualquier de ácido amino iso-butírico (Aib), un aminoácido disustituido con el mismo grupo 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 algunas realizaciones, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 del péptido relacionado con glucagón está sustituido con un aminoácido α,α -disustituido. En una realización específica, uno, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21, y 24 están sustituidos con Aib.

15 *Conjugados*

[0233] En algunas realizaciones, los péptidos (**Q**) descritos en el presente documento están glicosilados, amidados, carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclados a través de, por ejemplo, un puente disulfuro, o convertidos en una sal (por ejemplo, una sal de adición de ácido, una sal de adición de base), y/u opcionalmente dimerizados, multimerizados o polimerizados, o conjugados. Como se describe en el presente documento, **Q** puede ser un péptido de la superfamilia del glucagón, péptido relacionado con glucagón, incluyendo un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 ó 5, o la osteocalcina, la calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos.

[0234] La presente descripción también abarca conjugados en los que **Q** de Q-L-Y está unido además a un resto heterólogo. La conjugación entre **Q** y el resto heterólogo puede ser a través de unión covalente, unión no covalente (por ejemplo, interacciones electrostáticas, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals, puentes salinos, interacciones hidrofóbicas, y similares), o ambos tipos de unión. Puede utilizarse una variedad de sistemas de acoplamiento no covalentes, incluyendo biotina-avidina, ligando/receptor, enzima/sustrato, proteína de unión a ácido nucleico/ácido nucleico, proteína de unión a lípido/lípido, compañeros de moléculas de adhesión celular; o cualquier pareja de unión o fragmento de los mismos que tienen afinidad entre sí. En algunos aspectos, los enlaces covalentes son enlaces peptídicos. La conjugación de **Q** al resto heterólogo puede ser la conjugación indirecta o directa, la primera de las cuales puede implicar un enlazador o espaciador. Los enlazadores y espaciadores adecuados son conocidos en la técnica e incluyen cualquiera de los enlazadores o espaciadores descritos en el presente documento en las secciones "*Acilación y alquilación*" y "*El grupo de unión*", y en la subsección "*Modificación química de Q y/o L*."

[0235] Tal como se utiliza en el presente documento, el término "resto heterólogo" es sinónimo del término "resto conjugado" y se refiere a cualquier molécula (química o bioquímica, de origen natural o no codificada) que es diferente de **Q** al que está unido. Los restos conjugados de ejemplo que se pueden unir a **Q** incluyen, pero no se limitan, a un péptido o polipéptido heterólogo (incluyendo, por ejemplo, una proteína de plasma), un agente de reconocimiento, una inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o la región Fc), un marcador de diagnóstico, tal como un marcador radioisótopo, fluoróforo o enzimático, un polímero que incluye polímeros solubles en agua, u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En algunas realizaciones se proporciona un conjugado que comprende **Q** y una proteína plasmática, en el que la proteína de plasma se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas. En algunas realizaciones, el resto de proteína de plasma del conjugado es albúmina o transferrina. El conjugado en algunas realizaciones comprende **Q** y uno o más de un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o fragmento del mismo, un polímero, un punto cuántico, una molécula pequeña, una toxina, un agente de diagnóstico, un carbohidrato, un aminoácido.

50 *Resto heterólogo C-Terminal*

[0236] En algunas realizaciones, el resto heterólogo conjugado con **Q** es un péptido que es distinto de **Q** y el conjugado es un péptido de fusión o un péptido quimérico. En algunas realizaciones, cuando **Q** es un péptido de la superfamilia del glucagón, el resto heterólogo es una extensión de péptido de 1-21 aminoácidos. En realizaciones específicas, cuando **Q** es un péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, 2, 3, 4 o 5), la extensión se une a C-terminal de **Q**, por ejemplo, al aminoácido en la posición 29. En algunas realizaciones, la extensión comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1610 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 1611 (GGPSSGAPPPS-CONH 2), SEQ ID NO: 1614 (KRNRNIA), SEQ ID NO: 1643 (KRNR) o KGKKNWVKHNITQ (SEQ ID NO: 1613). En aspectos específicos, la secuencia de aminoácidos está unida a través del aminoácido C-terminal de **Q**, por ejemplo, aminoácido en la posición 29. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1610, 1611, 1613, 1614 y 1643 está unida al aminoácido 29 del péptido a través de un enlace peptídico. En algunas realizaciones específicas, el aminoácido en la posición 29 del péptido relacionado con glucagón (por ejemplo, un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 ó 5) es una Gly y la Gly se fusiona a una de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1610, 1611, 1613, 1614 y 1643.

Resto heterólogo de polímero

5 **[0237]** En algunas realizaciones, el resto heterólogo conjugado con **Q** es un polímero. En algunas realizaciones, el polímero se selecciona del grupo que consiste en: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos, incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros de polivinilo, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo) y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo alquilo Celulosa, hidroxialquilo Celulosa, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil celulosa, hidroxibutil metil celulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato acetato de celulosa, ftalato acetato de celulosa, carboxietil celulosa, triacetato de celulosa, y sal de sodio de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), y poli(tereftalato de etileno), y poliestireno.

20 **[0238]** En algunos aspectos, el polímero es un polímero biodegradable, que incluye un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido bórico), poli(ácido valérico), y poli(láctido-cocaprolactona)), y un polímero biodegradable natural (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones de rutina hechas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan por hidrólisis enzimática o exposición al agua *in vivo*, por erosión superficial o en masa.

30 **[0239]** En algunos aspectos, el polímero es un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por HS Sawhney, CP Pathak y JA Hubbell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

35 **[0240]** En algunas realizaciones, el polímero es un polímero soluble en agua o u polímero hidrófilo. Los polímeros hidrófilos se describen adicionalmente en este documento bajo el título "Grupos hidrófilos". Los polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropil butilcelulosa, hidroxipropil pentilcelulosa, metil celulosa, etil celulosa (Ethocel), hidroxietil celulosa, diversas alquilo Celulosas e hidroxialquilo Celulosas, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, copolímeros de acetato de vinilo/ácido crotonico, metacrilato de poli-hidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido metacrílico, polimetacrilato de metilo, copolímeros de anhídrido maleico/metil vinil éter, poli vinilalcohol, ácido poliacrílico sódico y cálcico, ácido poliacrílico, carboxi polímeros ácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxi-etileno y polioxi-propileno, anhídrido de polimetilviniléter co-maleico, carboximetilamida, co-polímero de metacrilato de potasio y divinilbenceno, polioxi-etilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

50 **[0241]** En realizaciones específicas, el polímero es un polialquilenglicol, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

55 **[0242]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, el hidrato de carbono es un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopeptina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano).

60 **[0243]** En algunas realizaciones, el grupo heterólogo es un lípido. El lípido, en algunas realizaciones, es un ácido graso, eicosanoide, prostaglandina, leucotrienos, tromboxano, N-acil etanolamina), glicerolípido (por ejemplo, mono, gliceroles mono-, di-, trisustituidos), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ejemplo, esfingosina, ceramida), lípido esteroide (por ejemplo, esteroide, colesterol), lípido prenol, sacarolípido, o un policétido, aceite, cera, colesterol, esteroide, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

Resto heterólogo de fusión a Fc

65 **[0244]** Como se señaló anteriormente, en algunas realizaciones, **Q** se conjuga, por ejemplo, se fusiona a una

inmunoglobulina o parte de la misma (por ejemplo, región variable, CDR, o la región Fc). Como se describe en el presente documento, **Q** puede ser un péptido de la superfamilia del glucagón, péptido relacionado con glucagón, incluyendo un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 ó 5, o la osteocalcina, la calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos. Los tipos conocidos de inmunoglobulinas (Ig) incluyen IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. La región Fc es una región C-terminal de una cadena pesada de Ig, que es responsable de la unión a los receptores Fc que llevan a cabo actividades, tales como el reciclaje (que se traduce en una semivida prolongada), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC), y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

[0245] Por ejemplo, según algunas definiciones, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde la Cys226 al extremo C-terminal de la cadena pesada. La "región bisagra" generalmente se extiende desde Glu216 a Pro230 de la IgG1 humana (regiones bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia de IgG1 mediante la alineación de las cisteínas implicadas en la unión a cisteína). La región Fc de una IgG incluye dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde el aminoácido 231 hasta el aminoácido 341. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende entre los aminoácidos 342 a 447. Las referencias a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, o regiones, se basan todas en Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Departamento de Salud Pública, Bethesda, MD. En realizaciones relacionadas, la región Fc puede comprender una o más regiones constantes modificadas o nativas de una cadena pesada de inmunoglobulina, diferente de CH1, por ejemplo, las regiones CH2 y CH3 de IgG e IgA, o las regiones CH3 y CH4 de IgE.

[0246] Los grupos de conjugado adecuados incluyen partes de secuencia de inmunoglobulina que incluyen el sitio de unión a FcRn. El FcRn, un receptor de salvamento, es responsable del reciclaje de inmunoglobulinas y su retorno a la circulación en la sangre. La región de la parte Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister et al 1994, Nature 372: 379). El área de contacto principal de la Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los sitios de contacto principales incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3.

[0247] Algunos grupos de conjugado pueden incluir o no un sitio o sitios de unión a FcγR. FcγR son responsables de ADCC y CDC. Los ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que realizan un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra inferior), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E), y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G) (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000). La región bisagra inferior de IgE también se ha implicado en la unión a FcRI (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568 a 15578, 1997). Los residuos implicados en la unión al receptor de IgA se describen en Lewis et al., (J Immunol. 175: 6694-701, 2005). Los residuos de aminoácidos implicados en la unión al receptor de IgE se describen en Sayers et al. (J Biol Chem. 279 (34): 35320-5, 2004).

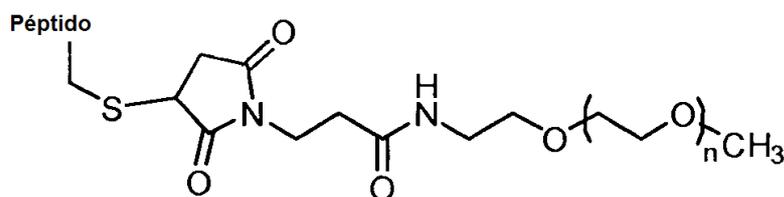
[0248] Las modificaciones de aminoácidos pueden realizarse en la región Fc de una inmunoglobulina. Dichas regiones Fc variantes comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH3 de la región Fc (residuos 342-447) y/o al menos una modificación de aminoácido en el dominio CH2 de la región Fc (residuos 231-341). Las mutaciones que se cree que transmiten una mayor afinidad por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276: 6591). Otras mutaciones pueden reducir la unión de la región Fc a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y/o FcγRIIIA sin reducir significativamente la afinidad por FcRn. Por ejemplo, la sustitución de Asn en la posición 297 de la región Fc por Ala u otro aminoácido elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado y puede dar lugar a una inmunogenicidad reducida con una semivida prolongada concomitante de la región Fc, así como una unión reducida a FcγRs (Routledge et al 1995, Transplantation 60: 847; Friend et al 1999, Transplantation 68: 1632; Shields y otros, 1995, J. Biol. Chem. 276: 6591). Se han realizado modificaciones de aminoácidos en las posiciones 233-236 de IgG1 han sido hechos que reducen la unión a FcγRs (Ward y Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 y Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29: 2613). Algunas sustituciones de aminoácidos de ejemplo se describen en las Patentes de Estados Unidos 7.355.008 y 7.381.408.

Resto heterólogo hidrófilo

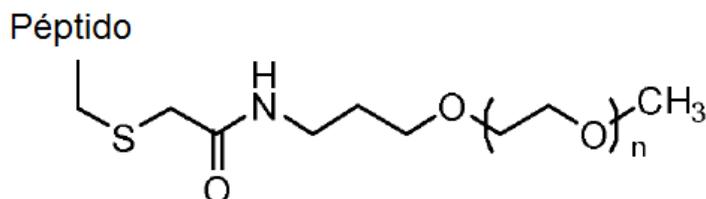
[0249] En algunas realizaciones, **Q** descrito en el presente documento está unido covalentemente a un resto hidrófilo. Como se describe en el presente documento, **Q** puede ser un péptido de la superfamilia del glucagón, péptido relacionado con glucagón, incluyendo un péptido relacionado con glucagón de la Clase 1, 2, 3, 4 ó 5, o la osteocalcina, la calcitonina, amilina, o un análogo, derivado o conjugado de los mismos. Los restos hidrófilos se pueden unir a **Q** en cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Se pueden usar cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo a través de acilación, alquilación reductora, adición de Michael, alquilación con tiol u otros métodos de conjugación/unión quimioselectiva a través de un grupo reactivo sobre el grupo PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α-haloacetilo, maleimido o hidrazino) a un grupo reactivo en el compuesto diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, éster, tiol,

α -haloacetilo, maleimido o hidrazino). Los grupos activadores que pueden utilizarse para enlazar el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen, sin limitación sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano, 5-piridilo y grupo acilo alfa-halogenado (por ejemplo, ácido alfa-yodo acético, ácido alfa-bromo acético, ácido alfa-cloro acético). Si se une al análogo mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un único aldehído reactivo, de manera que se controla el grado de polimerización. Véase, por ejemplo, Kinstler et al., Adv. Drugs. Delivery Rev. 54: 477-485 (2002); Roberts et al., Adv. Drug Delivery Rev. 54: 459-476 (2002); y Zalipsky et al., Adv. Drug Delivery Rev. 16: 157-182 (1995).

[0250] Grupos activantes adicionales que pueden utilizarse para unir el resto hidrófilo (polímero soluble en agua) a una proteína incluyen un grupo acilo alfa-halogenado (por ejemplo, ácido alfa-yodo acético, ácido alfa-bromoacético, ácido alfa-cloroacético). En aspectos específicos, un residuo de aminoácido del péptido que tiene un tiol es modificado con un resto hidrófilo, tal como PEG. En algunas realizaciones, un aminoácido en Q que comprende un tiol está modificado con PEG activado con maleimida en una reacción de adición de Michael para dar como resultado un péptido PEGilado que comprende el enlace tioéter que se muestra a continuación:



[0251] En algunas realizaciones, el tiol de un aminoácido de Q se modifica con un PEG activado con haloacetilo en una reacción de sustitución nucleófila para dar como resultado un péptido PEGilado que comprende el enlace tioéter se muestra a continuación:



[0252] Los grupos hidrófilos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol, polioles polioxietilados (por ejemplo, POG), sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), polioxialquilenos, propionaldehído con polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, mono (C₁-C₁₀) 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 (β -aminoácidos) (ya sean homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli (n-vinil pirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, ácidos colónicos u otros polímeros de polisacáridos, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos. Los dextranos son polímeros de polisacáridos de subunidades de glucosa, predominantemente unidas por uniones α 1-6. El dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, por ejemplo, de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 100 kD, o de aproximadamente 5, 10, 15 ó 20 kD a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ó 90 kD.

[0253] El resto hidrófilo, por ejemplo, cadena de polietilenglicol, según algunas otras realizaciones, tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Daltons, o aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En otra realización, el resto hidrófilo, por ejemplo, cadena de polietilenglicol, tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Daltons. En aún otros ejemplos de realización, el resto hidrófilo, por ejemplo, cadena de polietilenglicol, tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0254] Se contemplan polímeros hidrófilos lineales o ramificados. Las preparaciones resultantes de conjugados pueden ser esencialmente monodispersas o polidispersas, y pueden tener restos de aproximadamente 0,5, 0,7, 1, 1,2, 1,5 o 2 restos de polímero por péptido.

[0255] En algunas realizaciones, el aminoácido natural del péptido se sustituye con un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, para facilitar la unión del resto hidrófilo al péptido. Los aminoácidos de ejemplo incluyen Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o acetil fenilalanina (Ac-Phe). En otras otras realizaciones, se añade un aminoácido modificado para comprender un grupo hidrófilo al péptido en el extremo C-terminal.

[0256] En algunas realizaciones, el péptido del conjugado se conjuga a un resto hidrófilo, por ejemplo PEG, a través de enlace covalente entre una cadena lateral de un aminoácido del péptido y el resto hidrófilo. En algunas realizaciones, cuando **Q** es un péptido relacionado con glucagón de la clase 1, 2, 3, 4 o 5, el péptido se conjuga con un resto hidrófilo a través de la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, 29, 40, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, o una combinación de estas posiciones. En algunos aspectos, el aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo (por ejemplo, el aminoácido que comprende un resto hidrófilo) es una Cys, Lys, Orn, homo-Cys, o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está covalentemente unido a un resto hidrófilo (por ejemplo, PEG).

Resto heterólogo de rPEG

[0257] En algunas realizaciones, el conjugado de la descripción comprende un **Q** fusionado a un péptido accesorio que es capaz de formar una conformación extendida similar a PEG químico (por ejemplo, una molécula PEG recombinante (rPEG)), tales como los descritos en la publicación de solicitud de Patente Internacional No. WO2009/023270 y la publicación de la solicitud de Patente de Estados Unidos N° US20080286808. La molécula de rPEG no es polietilenglicol. La molécula de rPEG en algunos aspectos es un polipéptido que comprende una o más de glicina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina o prolina. En algunos aspectos, el rPEG es un homopolímero, por ejemplo, poli-glicina, poli-serina, poli-ácido glutámico, poli-ácido aspártico, poli-alanina, o poli-prolina. En otras realizaciones, el rPEG comprende dos tipos de aminoácidos repetidos, por ejemplo, poli (Gly-Ser), poli (Gly-Glu), poli (Gly-Ala), poli (Gly-Asp), poli (Gly-Pro), poli (Ser-Glu), etc. En algunos aspectos, el rPEG comprende tres tipos diferentes de aminoácidos, por ejemplo, poli (Gly-Ser-Glu). En aspectos específicos, el rPEG aumenta la semivida de **Q**. En algunos aspectos, el rPEG comprende una carga positiva neta o carga negativa neta. El rPEG en algunos aspectos carece de estructura secundaria. En algunas realizaciones, el rPEG es mayor que o igual a 10 aminoácidos de longitud y en algunas realizaciones es de aproximadamente 40 a aproximadamente 50 aminoácidos de longitud. El péptido accesorio en algunos aspectos se fusiona con el extremo N- o C-terminal del péptido de la descripción a través de un enlace peptídico o un sitio de escisión por proteinasa, o se inserta en los bucles del péptido de la descripción. El rPEG en algunos aspectos comprende una etiqueta de afinidad o está unido a un PEG que es mayor que 5 kDa. En algunas realizaciones, el rPEG confiere al conjugado de la descripción un mayor radio hidrodinámico, mayor semivida en suero, mayor resistencia a la proteasa, o mayor solubilidad y, en algunos aspectos, confiere el conjugado una menor inmunogenicidad.

[0258] **Q** puede estar unido a restos de conjugados a través de unión covalente directa haciendo reaccionar los residuos aminoácidos dirigidos del péptido con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos N-terminales o C-terminales de estos aminoácidos dirigidos. Los grupos reactivos en el péptido o resto conjugado incluyen, por ejemplo, un aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o grupo hidrazino. Los agentes de derivatización incluyen, por ejemplo, éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica. Alternativamente, los restos de conjugado se pueden enlazar al péptido indirectamente a través de portadores intermedios, tales como portadores de polisacáridos o polipéptidos. Ejemplos de portadores de polisacáridos incluyen aminodextrano. Ejemplos de portadores de polipéptidos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, co-polímeros de los mismos, y polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para conferir propiedades de solubilidad deseables en el portador cargado resultante.

Múltimeros

[0259] Con respecto a los péptidos relacionados con glucagón de Clase 1, Clase 2 y Clase 3, **Q** puede ser parte de un dímero, trímero o múltimero de orden superior comprende al menos dos, tres o más péptidos unidos a través de un enlazador, en el que al menos uno o ambos péptidos es un péptido relacionado con glucagón. El dímero puede ser un homodímero o, alternativamente, puede ser un heterodímero. En realizaciones de ejemplo, el enlazador que conecta los dos (o más) análogos es PEG, por ejemplo, un PEG de 5 kDa, un PEG de 20 kDa. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlace disulfuro. Por ejemplo, cada monómero del dímero puede comprender un residuo de Cys (por ejemplo, una Cys terminal o situada internamente) y el átomo de azufre de cada residuo de Cys participa en la formación del enlace disulfuro. En algunos aspectos, los monómeros están conectados a través de aminoácidos terminales (por ejemplo, N-terminal o C-terminal), a través de aminoácidos internos, o a través de un aminoácido terminal de al menos un monómero y un aminoácido interno de al menos otro monómero. En aspectos específicos, los monómeros no están conectados a través de un aminoácido N-terminal. En algunos aspectos, los monómeros del múltimero se unen en una orientación "cola con cola" en la que los aminoácidos C-terminales de cada monómero se unen. Un resto conjugado se puede unir covalentemente a cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón descritos en el presente documento, incluyendo un dímero, trímero o múltimero de orden superior.

Conjugación del resto heterólogo a Q

[0260] El resto heterólogo está conjugado al péptido (**Q**) según procedimientos de unión y conjugación descritos en

la sección "Grupo de unión" y subsección "Modificación química de Q y/o Y".

Procedimientos de fabricación de Q

5 [0261] Los péptidos (Q) descritos en el presente documento pueden prepararse por procedimientos estándar de síntesis, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro procedimiento de preparación de péptidos y proteínas de fusión. Aunque ciertos aminoácidos no naturales no se pueden expresar mediante técnicas de ADN recombinante estándar, las técnicas para su preparación son conocidos en la técnica. Los compuestos de esta descripción que abarcan porciones no peptídicas pueden sintetizarse mediante reacciones de química orgánica convencionales, además de las reacciones de química de péptidos convencionales cuando sea aplicable.

15 [0262] Los péptidos de la divulgación pueden obtenerse por procedimientos conocidos en la técnica. Los procedimientos adecuados de péptidos de síntesis de novo se describen en, por ejemplo, Chan et al, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido., 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido., 2000; y la patente de Estados Unidos N° 5.449.752.

20 [0263] Además, en los casos en los que los péptidos de la divulgación no comprenden cualquiera de los aminoácidos no codificados o no naturales, el péptido puede producirse de forma recombinante utilizando un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido usando procedimientos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Nueva York., 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994.

25 [0264] En algunas realizaciones, los péptidos de la divulgación están aislados. En algunas realizaciones, los péptidos de la divulgación están purificados. Se reconoce que la "pureza" es un término relativo, y no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta o enriquecimiento absoluto o selección absoluta. En algunos aspectos, la pureza es de al menos o aproximadamente el 50%, de al menos o aproximadamente el 60%, de al menos o aproximadamente el 70%, de al menos o aproximadamente el 80%, o de al menos o aproximadamente el 90% (por ejemplo, de al menos o aproximadamente el 91%, de al menos o aproximadamente el 92%, de al menos o aproximadamente el 93%, de al menos o aproximadamente el 94%, de al menos o aproximadamente el 95%, de al menos o aproximadamente el 96%, de al menos o aproximadamente el 97%, de al menos o aproximadamente el 98 %, de al menos o aproximadamente el 99% o es de aproximadamente el 100%.

35 [0265] En algunas realizaciones, los péptidos descritos en el presente documento se sintetizan comercialmente por empresas, tales como Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). A este respecto, los péptidos pueden ser sintéticos, recombinante, aislados, y/o purificados.

40 [0266] Las clases de péptidos relacionados con glucagón (Q) se describen en detalle a continuación. Con respecto a cada una de las secciones de la divulgación con respecto a los péptidos relacionados con glucagón de Clase 1, Clase 2, Clase 3, Clase 4 y Clase 5, las modificaciones se describen con respecto a la parte de péptido relacionado con glucagón (Q) de un conjugado Q-L-Y detallado anteriormente. Por lo tanto, los elementos estructurales descritos con respecto a una clase de péptidos relacionados con glucagón son elementos estructurales de Q que posteriormente se modifican adicionalmente para generar el conjugado Q-L-Y, tal como se describe anteriormente.

Péptidos relacionados con glucagón de Clase 1

50 [0267] En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es un péptido relacionado con glucagón de clase 1, que se describe en el presente documento y en la publicación de patente internacional No. WO 2009/155257 (publicada el 23 de diciembre de 2009), Solicitud de Patente Internacional No. WO 2008/086086 (publicada el 17 de julio, 2008), y la publicación de solicitud de patente Internacional N° WO 2007/056362 (publicada el 18 de mayo, 2007).

55 [0268] Las secuencias biológicas referenciadas en la sección siguiente (SEQ ID NOs: 801-915), relativa a los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 corresponden a SEQ ID NOs: 1-115 en la Publicación de Patente Internacional N° WO 2009/155257.

Actividad

60 [0269] Los péptidos de glucagón de la clase 1 conservan la actividad del receptor de glucagón en relación con el péptido de glucagón natural (SEQ ID NO: 801). Por ejemplo, el péptido de glucagón puede retener al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, actividad del 75%, actividad del 80%, actividad del 85%, o actividad del 90 de glucagón natural (calculada como la relación inversa de EC₅₀ para el péptido de glucagón frente a glucagón, por ejemplo, tal como se mide por la producción de AMPc utilizando el ensayo descrito en general en el ejemplo 2). En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón 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 de glucagón descritos en el presente documento presentan no más de aproximadamente 100%, 1000%, 10,000%, 100 000%, o 1.000.000% de la actividad de péptido de glucagón natural.

- 5 **[0270]** Cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento pueden presentar una EC₅₀ en el receptor de glucagón humano de aproximadamente 100 nM, 75 nM, 50 nM, 40 nM, 30 nM, 20 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM o menos cuando se prueban para la inducción de AMPc en células HEK293 que sobreexpresan el receptor de glucagón, por ejemplo, utilizando el ensayo del ejemplo 2. Los péptidos típicamente pegilados mostrarán una mayor EC₅₀ en comparación con el péptido no pegilado. Por ejemplo, los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento, cuando no están pegilados, pueden presentar actividad en el receptor de glucagón que es al menos 20% (por ejemplo, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60% , al menos 75%, al menos 80%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98%, al menos 99%, 100%, 150%, 200%, 400%, 500% o más) de la actividad de glucagón natural (SEQ ID NO: 801) en el receptor de glucagón. En ciertas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento muestran el % de actividad indicada de glucagón natural en el receptor de glucagón, cuando carecen un resto hidrófilo, pero muestran una disminución del % de actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, cuando comprende un resto hidrófilo. Por ejemplo, los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento, cuando están pegilados, pueden presentar actividad en el receptor de glucagón que es al menos 2% (por ejemplo al menos 3%, al menos 4%, al menos 5%, al menos 6%, al menos 7%, al menos 8%, al menos 9%, o al menos 10% de la actividad del glucagón natural. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento pueden mostrar cualquiera de las actividades anteriormente indicadas, pero no más de 1.000%, 10.000%, 100.000%, o 1.000.000% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón.
- 25 **[0271]** En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 muestran menos de aproximadamente 5%, 4%, 3%, 2% o 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 y/o más de aproximadamente 5 veces, 10 veces, o 15 veces la selectividad por el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1. Por ejemplo, en algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 muestran menos de 5% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 y muestran una selectividad mayor que 5 veces para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1.

Solubilidad mejorada

- 35 **[0272]** El glucagón natural presenta una mala solubilidad en solución acuosa, particularmente a pH fisiológico, con una tendencia a agregarse y precipitar con el tiempo. En cambio, los péptidos relacionados con glucagón de la clase 1 en algunas realizaciones muestran al menos 2 veces, 5 veces, o incluso una solubilidad más alta en comparación con el glucagón natural a un pH entre 6 y 8, o entre 6 y 9, por ejemplo, a un pH de 7 después de 24 horas a 25°C.
- 40 **[0273]** Por consiguiente, en algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de la clase 1 se ha modificado con respecto al péptido de tipo natural 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-Met-Leu-Asn-Thr (SEQ ID NO: 801) para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas, en particular a un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, mientras que se conserva la actividad biológica del péptido natural.
- 45 **[0274]** Por ejemplo, la solubilidad de cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento se puede mejorar aún más mediante la unión de un resto hidrófilo al péptido. La introducción de tales grupos también aumenta la duración de acción, por ejemplo, tal como se mide por una semivida prolongada en la circulación. Los restos hidrófilos se describen adicionalmente en el presente documento.

Modificaciones con residuos cargados

- 50 **[0275]** En algunas realizaciones, la solubilidad se mejora mediante la adición de carga al péptido relacionado con glucagón de clase 1 mediante la sustitución de aminoácidos naturales no cargados por aminoácidos cargados seleccionados del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico, o mediante la adición de aminoácidos cargados en el extremo amino o carboxilo del péptido.
- 55 **[0276]** Según algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 1 ha mejorado la solubilidad debido al hecho de que el péptido está modificado por sustituciones y/o adiciones de aminoácidos que introducen un aminoácido cargado en la parte C-terminal del péptido y, en algunas realizaciones, en una posición C-terminal a la posición 27 de la SEQ ID NO: 801. Opcionalmente, uno, dos o tres aminoácidos cargados pueden introducirse dentro de la parte C-terminal, y en algunas realizaciones C-terminal a la posición 27. Según algunas realizaciones, el aminoácido o aminoácidos naturales en las posiciones 28 y/o 29 están sustituidos con un aminoácido cargado, y/o de uno a tres aminoácidos cargados se añaden al extremo C-terminal del péptido, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En realizaciones de ejemplo, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todos de los aminoácidos cargados están cargados positivamente.

[0277] En realizaciones de ejemplo específicas, el péptido relacionado con glucagón de clase 1 puede comprender una cualquiera o dos de las siguientes modificaciones: sustitución de N28 con E; sustitución de N28 con D; sustitución de T29 con D; sustitución de T29 con 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.

[0278] Según una realización ejemplar, el péptido relacionado con glucagón de la clase 1 comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 811, o un análogo de la misma que contiene de 1 a 3 modificaciones de aminoácidos adicionales (que se describen en el presente documento en referencia a los agonistas de glucagón) en relación con el glucagón natural, o un análogo agonista de glucagón de los mismos. La SEQ ID NO: 811 representa un péptido relacionado con glucagón de la clase 1 modificado, en el que el residuo de asparagina en la posición 28 de la proteína natural ha sido sustituido por un ácido aspártico. En otra realización de ejemplo del 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 natural ha sido sustituido por ácido glutámico. Otras realizaciones de ejemplo incluyen péptidos relacionados con glucagón de la clase 1 de SEQ ID NOs: 824, 825, 826, 833, 835, 836 y 837.

[0279] La sustitución del aminoácido natural en la posición 28 y/o 29 con aminoácidos cargados, y/o la adición de uno a dos aminoácidos cargados en el extremo carboxilo del péptido relacionado con glucagón de la clase 1, mejora la solubilidad y estabilidad de los péptidos de glucagón en soluciones acuosas a pH fisiológicamente relevantes (es decir, un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5) en al menos 5 veces y como mucho 30 veces. Por consiguiente, los péptidos de glucagón de la clase 1 de algunas realizaciones retienen la actividad de glucagón y muestran al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o mayor solubilidad relativa al glucagón natural a un pH determinado entre aproximadamente 5,5 y 8, por ejemplo, pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C.

[0280] Las modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservativas, cuyas modificaciones se describen adicionalmente en el presente documento, se pueden aplicar al péptido relacionado con glucagón de la clase 1 que aún permitan que se retenga la actividad de glucagón.

Estabilidad mejorada

[0281] Cualquiera de los péptidos de glucagón de clase 1 pueden presentar, además, una mayor estabilidad y/o reducción de la degradación, por ejemplo, pueden retener al menos 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente documento pueden presentar, además, una estabilidad mejorada a un pH dentro del intervalo de 5,5 a 8, por ejemplo, pueden retener al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% del péptido original después de 24 horas a 25°C. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de la clase 1 de la invención muestran una estabilidad mejorada, tal como al menos 75% (por ejemplo, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, más del 95%, hasta el 100%) de una concentración del péptido o menos de aproximadamente el 25% (por ejemplo, menos de 20%, menos de 15%, menos de 10%, menos del 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, a 0%) de péptido degradado es detectable a 280 nm mediante un detector ultravioleta (UV) después de aproximadamente 1 o más semanas (por ejemplo, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente cuatro meses, seis meses, unos ocho meses, aproximadamente diez meses, aproximadamente doce meses) en solución a una temperatura de al menos 20°C (por ejemplo, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, por lo menos 27,5°C, al menos 30°C, al menos 35°C, al menos 40°C, al menos 50°C) y menos de 100°C, menos de 85°C, menos de 75°C, o menos de 70°C. Los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 pueden incluir modificaciones adicionales que alteran sus propiedades farmacéuticas, por ejemplo, aumento de potencia, semivida prolongada en la circulación, aumento de la vida útil, reducción de la precipitación o agregación, y/o reducción de la degradación, por ejemplo, reducción de la aparición de escisión o modificación química después del almacenamiento.

[0282] En todavía otras realizaciones adicionales de ejemplo, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 anteriores 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 de ejemplo, Asp en la posición 15 está sustituido con Glu, homoGlu, ácido cisteico, o ácido homo-cisteico.

[0283] Alternativamente, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el presente 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 de ejemplo, Ser en la posición 16 está sustituido con Thr o Aib, o cualquiera de las sustituciones de aminoácidos descritas en el presente documento con respecto a los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 que mejoran la potencia en el receptor de glucagón. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace peptídico entre Asp15-Ser16.

[0284] En algunas realizaciones, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 1 descritos en el

presente documento se pueden modificar adicionalmente para reducir la degradación en varias posiciones de aminoácidos mediante la modificación de una cualquiera, dos, tres, o cuatro de las posiciones 20, 21, 24, o 27. Las realizaciones de ejemplo incluyen la sustitución de Gln en la posición 20 por Ser, Thr, Ala o Aib, la sustitución de Asp en la posición 21 por Glu, la sustitución de Gln en la posición 24 por Ala o Aib, la sustitución de Met en la posición 27 por Leu o Nle. La eliminación o sustitución de metionina reduce la degradación debido a la oxidación de la metionina. La eliminación o sustitución de Gln o Asn reduce la degradación debido 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 una succinimida cíclica intermedia seguido de isomerización a iso-aspartato.

10 *Potencia mejorada*

[0285] Según otra realización, se proporcionan péptidos relacionados con glucagón de clase 1 que tienen una potencia mejorada en el receptor de glucagón, en la que los péptidos comprenden una modificación de aminoácidos en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 801). A modo de ejemplo no limitativo, dicha potencia mejorada se puede proporcionar mediante la sustitución de la serina de origen natural en la posición 16 por ácido glutámico o por otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente por uno 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. La sustitución de 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 más en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 1 conserva la selectividad por el receptor de glucagón en relación con los receptores de GLP-1, por ejemplo, una selectividad de al menos 5 veces, 10 veces, o de 15 veces.

25 *Resistencia a DPP-IV*

[0286] En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón de clase 1 descritos en el presente 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 están sustituidas con el aminoácido aminoácidos resistentes a DPP-IV descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, la posición 2 del péptido análogo está sustituido por un ácido aminoisobutírico. En algunas realizaciones, la posición 2 del péptido análogo está sustituida por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, glicina, N-metilo serina, y ácido ϵ -aminobutírico. En otra realización, la posición 2 del péptido relacionado con glucagón de clase 1 se sustituye por 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.

[0287] La reducción de la actividad de glucagón tras la modificación de los aminoácidos en la posición 1 y/o la posición 2 del péptido de glucagón puede ser restaurada mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón (aproximadamente aminoácidos 12-29). La estructura de hélice alfa puede ser estabilizado mediante, por ejemplo, la formación de un enlace covalente o puente intramolecular no covalente (por ejemplo, un puente de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones "i" y "i + 4", en las que i es un número entero de 12 a 25), la sustitución y/o inserción de aminoácidos alrededor de las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de la hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido α,α -disustituido), tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

Modificaciones en la posición 3

[0288] La actividad del receptor de glucagón se puede reducir mediante una modificación de aminoácidos en la posición 3 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural), por ejemplo, la sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 3, por un aminoácido ácido, básico, o un aminoácido hidrófobo. Por ejemplo, la sustitución en la posición 3 por ácido glutámico, ornitina, o norleucina reduce sustancialmente o destruye la actividad del receptor de glucagón.

[0289] La actividad mantenida o mejorada en el receptor de glucagón puede lograrse mediante la modificación de la Gln en la posición 3 por un análogo de glutamina, tal 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.

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

[0290] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la sustitución del ácido carboxílico del aminoácido C-terminal por un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster. A la inversa, conservando el ácido carboxílico natural en el extremo C-terminal del péptido se mantiene una selectividad relativamente mayor del péptido relacionado con glucagón de la clase 1 para el receptor de glucagón vs. el receptor de GLP-1 (por ejemplo, mayor de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 veces).

Otras modificaciones y combinaciones

5 **[0291]** Se puede realizar modificaciones adicionales al péptido relacionado con glucagón de la clase 1 que pueden aumentar aún más la solubilidad y/o estabilidad y/o actividad de glucagón. El péptido relacionado con glucagón de la clase 1 puede comprender alternativamente otras modificaciones que no afectan sustancialmente a la solubilidad o estabilidad, y que no disminuyen sustancialmente la actividad de glucagón. En realizaciones de ejemplo, 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 natural. Por ejemplo, pueden llevarse a cabo sustituciones conservativas o no conservativas, adiciones o deleciones en cualquiera de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29.

[0292] Las modificaciones de ejemplo del péptido relacionado con glucagón de la clase 1 incluyen, pero no se limitan a:

15 (a) sustituciones no conservativas, sustituciones conservativas, adiciones o supresiones a la vez que se conserva al menos parcialmente, la actividad agonista del glucagón, por ejemplo, sustituciones conservativas 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, la sustitución de Tyr en la posición 10 con Val o Phe, sustitución de Lys en la posición 12 con Arg, la sustitución de una o más de estas posiciones con Ala;

20 (b) deleción de los aminoácidos en las posiciones 29 y/o 28, y opcionalmente la posición 27, a la vez que se conserva, al menos parcialmente, la actividad agonista de glucagón;

25 (c) modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, por sustitución con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico, lo 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 tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con uno cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico, que también pueden reducir la degradación debido a la escisión del enlace Asp15-Ser16;

30 (d) adición de un resto hidrófilo, tal como el polímero soluble en agua polietilenglicol, tal como se describe en el presente 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 la semivida;

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

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

35 (g) la 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 succinimida cíclica intermedia, seguido por isomerización a iso-aspartato;

(h) modificaciones en la posición 1 o 2, tal como se describen en el presente documento, que mejoran la resistencia a la escisión de DPP-IV, opcionalmente en combinación con un puente intramolecular, tales como un puente de lactama entre las posiciones "i" y "i + 4", en el que i es un número entero de 12 a 25, por ejemplo, 12, 16, 20, 24;

40 (i) acilar o alquilar el péptido de glucagón, tal como se describe en el presente documento, lo que puede aumentar la actividad en el receptor de glucagón y/o el receptor de GLP-1, aumentar la semivida en circulación y/o extender la duración de acción y/o retrasar el inicio de acción, combinado opcionalmente con la adición de un resto hidrófilo, adicional o alternativamente, combinado opcionalmente con una modificación que reduce selectivamente la actividad en el péptido GLP-1, por ejemplo, una modificación de la 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; eliminación de aminoácidos C-terminales al aminoácido en la posición 27 (por ejemplo, la supresión de uno o ambos de los aminoácidos en las posiciones 28 y 29, produciendo un péptido de 27 o 28 aminoácidos de longitud);

(j) extensiones C-terminal, tal como se describen en el presente documento;

50 (k) homodimerización o heterodimerización, tal como se describen en el presente documento; y combinaciones de (a) a (k).

[0293] En algunas realizaciones, las modificaciones de ejemplo del péptido relacionado con glucagón de la clase 1 incluyen al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo A y una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo B y/o el Grupo C, donde 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;

60 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;

65 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;

5 o combinaciones de los mismos;

donde el grupo B es:

sustitución de Asp en la posición 15 con Glu;
 sustitución de Ser en la posición 16 con Thr o Aib; y

donde el grupo C es:

10 sustitución de His en la posición 1 con un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
 sustitución de Ser en la posición 2 con un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),

15 sustitución de Lys en la posición 12 con Arg;

sustitución de Gln en la posición 20 con Ser, Thr, Ala o Aib;

sustitución de Asp en la posición 21 con Glu;

sustitución de Gln en la posición 24 con Ser, Thr, Ala o Aib;

sustitución de Met en la posición 27 con Leu o Nle;

deleción de los aminoácidos en las posiciones 27-29;

20 deleción de los aminoácidos en las posiciones 28-29;

deleción del aminoácido en la posición 29;

o combinaciones de los mismos.

25 **[0294]** En realizaciones de ejemplo, Lys en la posición 12 se sustituye con Arg. En otras otras realizaciones de ejemplo los aminoácidos en las posiciones 29 y/o 28, y opcionalmente en la posición 27, se eliminan.

30 **[0295]** En algunas otras realizaciones específicas, el péptido de glucagón comprende (a) una modificación de aminoácido en la posición 1 y/o 2 que confiere resistencia a 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 α,α -disustituido, opcionalmente (c) unido a un resto hidrófilo, tal 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) unido a la SEQ ID NO: 820. Cuando el péptido de glucagón está unido a la SEQ ID NO: 820, el aminoácido en la posición 29 en ciertas realizaciones es Thr o Gly. En otras realizaciones específicas, el péptido de glucagón comprende (a) Asp28Glu29, o Glu28Glu29, o Glu29Glu30, o Glu28Glu30 o Asp28Glu30, y opcionalmente (b) una modificación de aminoácido en la posición 16 que sustituye Ser con, por ejemplo, Thr o Aib, y opcionalmente (c) una modificación de aminoácido 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 de glucagón es T16, A20, E21, A24, Nle27, D28, E29.

45 **[0296]** En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la 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-Z
 (SEQ ID NO: 839) con 1 a 3 modificaciones de aminoácidos en la misma,

en la que X1 y/o X2 es un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad de (o aumenta la resistencia de) el péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),

50 en la que Z se selecciona del grupo que consiste en -COOH (el carboxilato C-terminal de origen natural), -Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, y Y-COOH, en la que Y es de 1 a 2 aminoácidos, y

en la que 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, en el que i es 12, 16, 20 o 24.

55 **[0297]** En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente de lactama. En algunas realizaciones, los aminoácidos en las posiciones i e i + 4 de la 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-dimetil imidaazol 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 de glucagón se une 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 de ejemplo, este resto hidrófilo está unido covalentemente a una Lys, Cys, Orn, homocisteína, o residuo acetil-fenilalanina en cualquiera de estas posiciones. Los restos hidrófilos de ejemplo incluyen polietilenglicol (PEG), por ejemplo, de un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, o de aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

65 **[0298]** En otras realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase I comprende la secuencia de

aminoácidos:

5 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),

10 en la que X1 y/o X2 es un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad de (o aumenta la resistencia de) el péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
en la que uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 del péptido de glucagón están sustituidas
15 con un aminoácido alfa, alfa-disustituido, y
en la que Z se selecciona del grupo que consiste en -COOH (carboxilato C-terminal de origen natural), Asn-COOH, Asn-Thr-COOH, y Y-COOH, en la que Y es de 1 a 2 aminoácidos.

[0299] Otras modificaciones de aminoácidos a modo de ejemplo a los péptidos relacionados con glucagón de clase
20 1 o análogos anteriores 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 es un aminoácido no natural o de origen natural, sustitución de
25 Lys en la posición 12 con Arg; sustitución de Asp en la posición 15 con Glu; sustitución de Ser en la posición 16 con
Thr o Aib; sustitución de Gln en la posición 20 con Ser, Thr, Ala o Aib; sustitución de Asp en la posición 21 con
Glu; sustitución de Gln en la posición 24 con Ser, Thr, Ala o Aib; sustitución de Met en la posición 27 con Leu o
Nle; 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
30 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 en la posición 30 (es decir,
después de la posición 29) de Glu o Lys; opcionalmente con la inserción en la posición 31 de Lys; adición de la SEQ
ID NO: 820 a la C-terminal, opcionalmente, en el que el aminoácido en la posición 29 es Thr o Gly; sustitución o
35 adición de un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo; o una combinación de los mismos.

[0300] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a los agonistas de glucagón de Clase
40 1 que aumentan la actividad del receptor de glucagón, retienen la actividad parcial del receptor de glucagón, mejoran
la solubilidad, aumentan la estabilidad, o reducen la degradación se puede aplicar a los péptidos de glucagón de
clase 1 individualmente o en combinación. Por lo tanto, se pueden preparar péptidos relacionados con glucagón de
clase 1 que retienen al menos 20% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón, y que son
solubles a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8 o entre 6 y 9, (por ejemplo, pH 7), y
45 opcionalmente retienen al menos 95% del péptido original (por ejemplo 5% o menos del péptido original es
degradado o escindido) después de 24 horas a 25°C. Alternativamente, se pueden preparar péptidos de glucagón
clase 1 de alta potencia que muestran al menos aproximadamente 100%, 125%, 150%, 175%, 200%, 250%, 300%,
350%, 400%, 450%, 500%, 600 %, 700%, 800%, 900% o 10 veces o más de la actividad de glucagón natural en el
receptor de glucagón, y opcionalmente son solubles a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8 o
entre 6 y 9, (por ejemplo, pH 7), y retienen opcionalmente al menos 95% del péptido original (por ejemplo 5% o
50 menos del péptido original es degradado o escindido) después de 24 horas a 25°C. En algunas realizaciones, los
péptidos de glucagón de clase 1 descritos en el presente documento pueden presentar por lo menos cualquiera de
los niveles relativos indicadas anteriormente de actividad en el receptor de glucagón pero no más de 1.000%,
5.000% o 10.000% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón.

Ejemplos de realizaciones de péptidos relacionados con glucagón de Clase 1,

55 [0301] Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón natural de la SEQ ID NO: 801 es modificado por la
sustitución del aminoácido natural en la posición 28 y/o 29 con un aminoácido cargado negativamente (por ejemplo,
ácido aspártico o ácido glutámico) y opcionalmente la adición de un aminoácido cargado negativamente (por
ejemplo, ácido aspártico o ácido glutámico) en el extremo carboxi del péptido. En una realización alternativa, el
60 péptido de glucagón natural de la SEQ ID NO: 801 es modificado por la sustitución del aminoácido natural en la
posición 29 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) y opcionalmente la
adición de uno o dos aminoácidos cargados positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en el extremo
carboxi terminal del péptido. Según algunas realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón que tiene una
mejor solubilidad y estabilidad en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 834
65 con la condición de que al menos uno aminoácidos en la posición, 28, o 29 está sustituido con un aminoácido ácido
y/o se añade un aminoácido ácido 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.

5 **[0302]** Según algunas realizaciones, se proporciona un agonista del glucagón que tienen 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 natural (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). Según algunas otras realizaciones se proporciona un agonista de glucagón 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 de uno a dos aminoácidos, seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu, añadidos al extremo carboxi del péptido de glucagón.

15 **[0303]** Se ha decrito que ciertas posiciones del péptido de glucagón natural pueden ser modificadas al tiempo que conserva al menos parte de la actividad del péptido precursor. Según ello, los solicitantes prevén que uno o más de los aminoácidos localizados en las posiciones en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 del péptido de la SEQ ID NO: 811 puede ser sustituidos con un aminoácido diferente del presente en el péptido de glucagón natural, y aún conservan la potencia mejorada, estabilidad de pH fisiológico y actividad biológica del péptido similar al glucagón original. Por ejemplo, según algunas realizaciones, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido natural se cambia a leucina o norleucina para evitar la degradación oxidativa del péptido.

25 **[0304]** En algunas realizaciones se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 833, donde 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 de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 801. Según otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 833 en el que 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 de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 801. En otra realización, se proporciona un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 807, SEQ ID NO: 808 o la SEQ ID NO: 834 en el que de 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 de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 801, y en una realización adicional dichos uno a dos diferentes aminoácidos representan sustituciones conservativas de aminoácidos en relación con el aminoácido presente en la secuencia natural (SEQ ID NO: 801). En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 813 en el que el péptido de glucagón comprende además una, dos o tres sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12: 811 o la SEQ ID NO, 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 conservativas de aminoácidos.

40 **[0305]** En algunas realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 801 en el que el análogo difiere de SEQ ID NO: 801 por tener un aminoácido distinto de serina en la posición 2 y por tener un aminoácido ácido sustituido para el aminoácido natural en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi del péptido de la 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 la SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o la SEQ ID NO: 832 en donde el análogo difiere de la molécula original por una sustitución en la posición 2. Más particularmente, la posición 2 del péptido análogo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, alanina, D-alanina, glicina, n-metil serina y ácido aminoisobutírico.

50 **[0306]** En otra realización, se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 801 en el que el análogo difiere de SEQ ID NO: 801 por tener un aminoácido distinto de histidina en la posición 1 y por tener un aminoácido ácido sustituido para el aminoácido natural en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi del péptido de la 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 la SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o la SEQ ID NO: 832 en donde el análogo difiere de la molécula original por una sustitución en la posición 1. Más particularmente, la posición 1 del péptido análogo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de DMIA, D-histidina, desaminohistidina, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina.

60 **[0307]** Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón modificado 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 de glucagón que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o la SEQ ID NO: 832 que comprende además uno o dos aminoácidos, añadidos a la C-terminal de SEQ ID NO: 809, SEQ ID NO: 812, SEQ ID NO: 813 o la SEQ ID NO: 832, en el que 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 extremo 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.

[0308] En otra realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 807 o un análogo agonista de glucagón del mismo. 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 de 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 C-terminal del péptido de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811 o la SEQ ID NO: 813, y en una realización aún más el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811.

[0309] Según algunas otras realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido de 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-Met-Leu-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 NO: 813)

en donde Xaa en la posición 15 es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homocisteico, ácido homocisteico, el Xaa en la posición 28 es Asn o un aminoácido ácido y el Xaa en la posición 29 es Thr o un aminoácido ácido y R es un aminoácido ácido, COOH o CONH₂, con la condición de que un residuo aminoácido ácido está presente en una de las posiciones 28, 29 o 30. En algunas realizaciones R es COOH, y en otra realización R es CONH₂.

[0310] 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 de glucagón para mejorar la estabilidad y solubilidad del péptido de glucagón. Más particularmente, el péptido de glucagón de fusión puede comprender un análogo agonista de glucagón que comprende un péptido de 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 R es un aminoácido ácido o un enlace y una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNR) unida al aminoácido carboxi terminal del péptido de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 833, SEQ ID NO: 807 o la SEQ ID NO: 808 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNR) unida al aminoácido carboxi terminal del péptido de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido de fusión de glucagón comprende la 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 de la misma, que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón. Según 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, en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 821 (KRNRNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNR) está unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón a través de un enlace peptídico. En algunas otras realizaciones la parte de péptido de 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 otras realizaciones la parte de péptido de glucagón de la fusión del péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 811 o la SEQ ID NO: 813, en el 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.

[0311] En otra realización, la secuencia del péptido de 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 (KRNRNIA) o SEQ ID NO: 822 (KRNR) unida al aminoácido 29 del péptido de 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. Típicamente, los péptidos de fusión de la descripción tendrán un aminoácido C-terminal con el grupo ácido carboxílico estándar. Sin embargo, los análogos de las secuencias en el que el aminoácido C-terminal tiene una amida sustituida por el ácido carboxílico también se incluyen como realizaciones. Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón de fusión comprende un análogo

agonista de 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) unida al aminoácido 29 del péptido de glucagón.

5 **[0312]** Los agonistas de glucagón de la presente invención 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 de glucagón. Según algunas realizaciones, la introducción de grupos hidrófilos en una o más posiciones seleccionadas de las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido de la SEQ ID NO: 811, o un análogo agonista de glucagón de la misma, se prevé que mejoran la solubilidad y la estabilidad del pH del análogo de glucagón. Más particularmente, en algunas realizaciones, el péptido de glucagón de la 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 de glucagón.

15 **[0313]** Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón de la 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, donde el aminoácido natural es sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo por ejemplo, PEG. El péptido natural puede estar sustituido con un aminoácido de origen natural o sintético (de origen no natural). Los aminoácidos sintéticos o de origen no natural se refieren a aminoácidos que no ocurren de forma natural *in vivo* pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas en el presente documento.

25 **[0314]** En algunas realizaciones, se proporciona un agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 810, SEQ ID NO: 811 o la SEQ ID NO: 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 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 natural, en el que el sustituto de aminoácido comprende además un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, la sustitución es en la posición 21 o 24, y en una realización adicional el resto hidrófilo es una cadena de PEG. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón de la 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, incluyendo, por ejemplo, maleimido, vinil sulfona, 2-piridiltio, haloalquilo, y haloacilo. Estos reactivos reactivos con tiol pueden contener carboxi, ceto, hidroxilo y grupos éter, así como otros restos hidrófilos, tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, el péptido de glucagón natural se sustituye con lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina de sustitución se modifica adicionalmente utilizando reactivos reactivos con amina, tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc) de ácidos carboxílicos o aldehídos de restos hidrófilos tales como polietilenglicol. En algunas realizaciones, el péptido de 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.

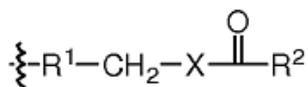
35 **[0315]** Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón pegilado comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unido covalentemente al péptido de glucagón en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones el agonista del glucagón pegilado comprende un péptido de la 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 donde el peso molecular combinado de los dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 Daltons. En otra realización el agonista de glucagón pegilado comprende un péptido de la SEQ ID NO: 806, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en donde el peso molecular combinado de los dos cadenas de PEG es de aproximadamente 5.000 a aproximadamente 20.000 Daltons.

50 **[0316]** La cadena de polietilenglicol puede estar en forma de una cadena lineal o puede ser ramificado. Según algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol, tiene un peso molecular medio seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Daltons. En otra realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

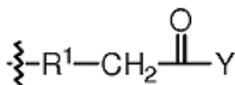
55 **[0317]** Cualquiera de los péptidos de glucagón descritos anteriormente se pueden modificar adicionalmente para incluir un enlace covalente o puente intramolecular no covalente o un aminoácido estabilizador de hélice alfa dentro de la parte C-terminal del péptido de glucagón (posiciones de aminoácidos 12-29). Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende una cualquiera o más de las modificaciones descritas anteriormente, además de una sustitución de aminoácido en las posiciones 16, 20, 21, o 24 (o una combinación de los mismos) con un aminoácido alfa, alfa-disustituido, por ejemplo, Aib. Según otra realización, el péptido de glucagón comprende una cualquiera 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 de glucagón.

65 **[0318]** Según algunas realizaciones, el péptido de 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

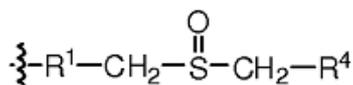
III:



Estructura I



Estructura II



Estructura III

en la que R¹ es alquilo C₀₋₃ o heteroalquilo C₀₋₃; R² es NHR⁴ o alquilo C₁₋₃; R³ es alquilo C₁₋₃; R⁴ es H o alquilo C₁₋₃; X es NH, O, o S; e Y es NHR⁴, SR³, o OR³. En algunas realizaciones, X es 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 de ejemplo, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de estructura I en el que, R¹ es CH₂-S, X es NH, y R₂ es CH₃ (acetamidometilo-cisteína, C(Acm)); R¹ es CH₂, X es NH, y R² es CH₃ (ácido acetildiaminobutanoico, Dab (Ac)); R¹ es alquilo C₀, X es NH, R² es NHR⁴, y R⁴ es H (ácido carbamoildiaminopropanoico, Dap (urea)); o R¹ es CH₂-CH₂, X es NH, y R² es CH₃ (acetilornitina, Orn (Ac)). En otras realizaciones de ejemplo se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura II, en la que R¹ es CH₂, Y es NHR⁴, y R⁴ es CH₃ (metilglutamina, Q(Me)); En otras realizaciones de ejemplo se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la estructura III en la que R¹ es CH₂ y R⁴ es H (sulfóxido de metionina, M(O)); En realizaciones específicas, el aminoácido en 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.

[0319] En ciertas realizaciones, el péptido de glucagón es un análogo del péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 877. En aspectos específicos, el análogo comprende cualquiera de las modificaciones de aminoácidos descritas 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 cisteico, y ácido homocisteico; 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 cisteico, y ácido homocisteico; 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-Lys; y una combinación de los mismos.

[0320] En ciertas realizaciones, el análogo del péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 877 comprende un aminoácido alfa,alfa-disustituido, tal como Aib, en una, dos, tres, o la totalidad de las posiciones 16, 20, 21, y 24.

[0321] En ciertas realizaciones, el análogo del péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 877 comprende una o más de los siguientes: sustitución de His en la posición 1 con un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), la sustitución de Ser en la posición 2 con un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV), la 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 con Phe o Val; sustitución de Lys en la posición 12 con Arg; sustitución de Asp en la posición 15 con Glu, la sustitución de Ser en la posición 16 con Thr o Aib; sustitución de Gln en la posición 20 con Ala o Aib; sustitución de Asp en la posición 21 con Glu; sustitución de Gln en la posición 24 con Ala o Aib; sustitución de Met en la posición 27 con Leu o Nle; delección de los aminoácidos en las posiciones 27-29; delección de los aminoácidos en las posiciones 28-29; delección del aminoácido en las posiciones 29; adición de la

secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 820 a la C-terminal, en el que el aminoácido en la posición 29 es Thr o Gly, o una combinación de los mismos.

5 **[0322]** Según realizaciones específicas, el péptido de glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 862-867 y 869-874.

10 **[0323]** En ciertas realizaciones, el análogo del péptido de glucagón que comprende la SEQ ID NO: 877 comprende un resto hidrófilo, por ejemplo, PEG, unido covalentemente al aminoácido en cualquiera de las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 y 29 o en el aminoácido C-terminal.

15 **[0324]** En ciertas realizaciones, el análogo del péptido de glucagón que comprende la SEQ ID NO: 877 comprende un aminoácido que comprende una cadena lateral unida covalentemente, opcionalmente, a través de un espaciador, a un grupo acilo o un grupo alquilo, cuyo grupo acilo o grupo alquilo es aminoácido de origen natural o no 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.

20 **[0325]** 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 agonista del glucagón. En ciertas realizaciones, el agonista de glucagón comprende los aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 859-919.

Péptidos relacionados con glucagón de clase 2

25 **[0326]** En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es un péptido relacionado con glucagón de la Clase, que se describe en el presente documento y en la publicación de patente internacional No. WO 2010/011439 y solicitud de patentes de Estados Unidos No. 61/187,578, (presentada el 16 de junio, 2009).

30 **[0327]** Las secuencias biológicas referenciadas en la sección siguiente (SEQ ID NOs: 1001-1262) relativas a los péptidos relacionados con glucagón de la clase 2 corresponden a las SEQ ID NOs: 1 a 262 en la publicación de Patente Internacional N° WO 2010/011439. Las SEQ ID NOs: 1263-1275 relativas a los péptidos relacionados con glucagón corresponden a SEQ ID NOs: 657-669 en la solicitud de Estados Unidos N° 61/187.578.

Actividad

35 **[0328]** El glucagón natural no activa el receptor de GIP, y normalmente tiene aproximadamente 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. Las modificaciones en la secuencia de glucagón natural descritas en el presente documento producen péptidos relacionados con glucagón de clase 2 que pueden mostrar una actividad de glucagón potente equivalente o mejor que la actividad de glucagón natural (SEQ ID NO: 1001), una actividad de GIP potente equivalente o mejor que la actividad de GIP natural (SEQ ID NO: 1004), y/o una actividad de GLP-1 potente equivalente o mejor que la actividad de GLP-1 natural. En este sentido, el péptido relacionado con glucagón de clase 2 puede ser uno de un coagonista de glucagón/GIP, triagonista de glucagón/GIP/GLP-1, coagonista de GIP/GLP-1, o un péptido de glucagón agonista de GIP, tal como se describe adicionalmente en el presente documento.

45 **[0329]** En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 descritos en el presente 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 glucagón de clase 2 presentan una EC₅₀ 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 glucagón de clase 2 presentan una EC₅₀ 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 el ensayo de células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor y un gen de luciferasa ligado a un elemento sensible a AMPc, tal como se describe en el Ejemplo 2.

50 **[0330]** En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 muestran al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 5%, 10 %, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% o más actividad en el receptor GIP en relación con GIP natural (potencia de GIP). En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en el presente documento no muestran más de 1000%, 10000%, 100000%, o 1.000.000% de actividad en el receptor de GIP en relación con GIP natural. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 muestran al menos aproximadamente 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175 %, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450% o 500% o más actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural (potencia de glucagón). En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en el presente documento no muestran más de 1000%, 10000%, 100 000%, o 1.000.000% de actividad en el receptor de glucagón en relación con

el glucagón natural. En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 muestran al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 5%, 10%, 20 %, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175% o 200% o más actividad en el receptor de GLP-1 receptor con relación a GLP-1 (potencia de GLP-1). En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en el presente documento no muestran más de 1000%, 10000%, 100000%, o 1.000.000% de actividad en el receptor de GLP-1 con respecto al GLP-1 natural. La actividad de un péptido relacionado con glucagón de clase 2 en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de EC₅₀ para el péptido relacionado con glucagón de Clase 2 vs. el ligando natural.

[0331] En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de Clase 2 muestran actividad tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GIP ("coagonistas de glucagón/GIP"). Estos péptidos relacionados con glucagón de clase 2 han perdido selectividad de glucagón natural para el receptor de glucagón en comparación con receptor GIP. En algunas realizaciones, la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de clase 2 en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su EC₅₀ en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido relacionado con 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 relación de la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ 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, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP del péptido relacionado con glucagón de clase 2 en comparación con la potencia de glucagón del péptido relacionado con de glucagón de clase 2 es menor que aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 , 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GIP dividida por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la actividad de GLP-1 se ha reducido significativamente o destruido, por ejemplo, mediante una modificación de aminoácidos en la posición 7, una delección de aminoácido(s) C-terminal para el aminoácido en la posición 27 o 28, produciendo un péptido de 27 o 28 aminoácidos, o una combinación de los mismos.

[0332] En otro aspecto, los péptidos relacionados con glucagón de Clase 2 presentan una actividad en los receptores de glucagón, GIP y GLP-1 ("triagonistas de glucagón/GIP/GLP-1"). Estos péptidos relacionados con glucagón de clase 2 han perdido selectividad de glucagón natural para el receptor de glucagón en comparación con los receptores de GIP y de GLP-1. En algunas realizaciones, la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de clase 2 en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de sus respectivas EC₅₀ en los receptores de glucagón y GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia de GIP del péptido relacionado con 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 EC₅₀ del tri-agonista en el receptor GIP dividida por la EC₅₀ del tri-agonista en el receptor de GLP-1 es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30 , 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013 , 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GIP del triagonista en comparación con la potencia de GLP-1 del triagonista es menos de aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GIP dividida por la potencia en el receptor de GLP-1 es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05 , 0,067, 0,1, 0,2). En realizaciones relacionadas, la relación de la EC₅₀ de la triagonista en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ del triagonista en el receptor de glucagón es menor que aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20 , 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia GIP del triagonista en comparación con la potencia de glucagón del triagonista es menos de aproximadamente 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 60 , 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GIP dividida por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 del triagonista en comparación con la potencia de glucagón del triagonista es menos de aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GLP-1 dividido por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de GLP-1 del triagonista en comparación con la potencia de glucagón del triagonista es menos de aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia en el receptor de GLP-1 dividido por la potencia en el receptor de glucagón es de aproximadamente 1 o menos de aproximadamente 1 (por ejemplo, aproximadamente 0,01, 0,013, 0,0167, 0,02, 0,025, 0,03, 0,05, 0,067, 0,1, 0,2).

[0333] En otro aspecto adicional, los péptidos relacionados con glucagón d3 clase 2 muestran actividad en los receptores de GLP-1 y GIP, pero en el que la actividad de glucagón se ha reducido o destruido significativamente ("coagonistas de GIP/GLP-1"), por ejemplo, por una modificación de aminoácidos en la posición 3. Por ejemplo, la sustitución en esta posición con un aminoácido ácido, básico, o un aminoácido hidrófobo (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reduce la actividad de glucagón. En algunas realizaciones, la EC₅₀ del péptido de glucagón en el receptor de GIP es inferior a aproximadamente 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces diferente (mayor o menor) de su EC₅₀ en el receptor de GLP-1. En algunas realizaciones, la potencia GIP del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 es inferior a aproximadamente 25, 20, 15, 10, o 5 veces diferente (mayor o menor) de su potencia de GLP-1. En algunas realizaciones, estos péptidos relacionados con glucagón de clase 2 tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o mayor que aproximadamente 0,1%, pero menos de aproximadamente 10%. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 en el receptor de GIP dividida por la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de clase 2 en el receptor de GLP-1 es menor que 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 de GIP del péptido relacionado con glucagón de Clase 2 en comparación con la potencia de GLP-1 del péptido relacionado con glucagón de clase 2 es menor de aproximadamente 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, o 5, y no menos de 1.

[0334] En un aspecto adicional, los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 muestran actividad en el receptor de GIP, en el que la actividad de glucagón y GLP-1 se han reducido significativamente o destruido ("péptidos de glucagón agonistas de gip"), por ejemplo, mediante modificaciones de aminoácidos en las posiciones 3 con Glu y 7 con Ile. En algunas realizaciones, estos péptidos relacionados con glucagón de clase 2 tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o mayor que aproximadamente 0,1%, 0,5% o 1% pero menos de aproximadamente 1%, 5%, o 10%. En algunas realizaciones estos péptidos relacionados con glucagón de clase 2 también tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, por ejemplo aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o mayor que aproximadamente 0,1 %, 0,5%, o 1% pero menos de aproximadamente 1%, 5%, o 10%.

[0335] En algunas realizaciones, cuando el péptido relacionado con glucagón de clase 2 no está pegilado, la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de clase 2 para la activación del receptor de GIP es aproximadamente 4, 2, 1 nM o menos, o el análogo tiene al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP. En realizaciones relacionadas, la EC₅₀ de los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 no pegilados para la activación del receptor de GLP-1 es de aproximadamente 4, 2, 1 nM o menos o tiene al menos aproximadamente 1%, 2%, 3%, 4% o 5% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En aún otras realizaciones relacionadas, la EC₅₀ del péptido relacionado con glucagón de clase 2 no pegilado para la activación del receptor de glucagón es aproximadamente 4, 2, 1 nM o menos, o al menos aproximadamente 5%, 10%, 15% o 20% de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 2 no pegilado tiene menos de aproximadamente 1% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón. En otras realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 2 no pegilado tiene menos de aproximadamente 10%, 5% o 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

[0336] En realizaciones en las que los péptidos relacionados con glucagón de Clase 2 están unidos a restos hidrófilos tales como PEG, Las EC₅₀ relativas en uno o más receptores pueden ser mayores por ejemplo, aproximadamente 10 veces mayor. Por ejemplo, la EC₅₀ de un análogo pegilado para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos, o el péptido relacionado con glucagón de Clase 2 tiene al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5% de la actividad de GIP natural en el receptor de GIP. En realizaciones relacionadas, la EC₅₀ de un péptido relacionado con glucagón de clase 2 pegilado para la activación del receptor de GLP-1 es de aproximadamente 10 nM o menos o tiene al menos aproximadamente 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4% o 0,5% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En aún otras realizaciones relacionadas, la EC₅₀ de un péptido relacionado con glucagón de clase 2 pegilado para la activación del receptor de glucagón es de aproximadamente 10 nM o menos, o al menos aproximadamente 0,5%, 1%, 1,5% o 2% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 2 tiene menos de aproximadamente 1% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón. En otras realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 2 tiene menos de aproximadamente 10%, 5% o 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

Modificaciones

[0337] Las modificaciones descritas en el presente documento en referencia a un péptido relacionado con glucagón de Clase 2 permiten la manipulación de glucagón (SEQ ID NO: 1001) para crear péptidos de glucagón que muestran una mayor actividad GIP, actividad de glucagón, y/o actividad de GLP-1. Otras modificaciones descritas en el presente documento en referencia a un péptido relacionado con glucagón Clase 2 prolongan la semivida, aumentan la solubilidad, o aumentan la estabilidad del péptido resultante. Aún otras modificaciones descritas en el presente documento en referencia a un péptido relacionado con glucagón de clase 2 no tienen ningún efecto sobre la

actividad, o pueden producirse sin destruir la actividad o actividades deseadas. Cualquiera de las combinaciones en referencia a un péptido relacionado con glucagón de clase 2 que sirven al mismo propósito (por ejemplo, aumento de la actividad GIP) se pueden aplicar individualmente o en combinación. Cualquiera de las entidades individuales o conjuntos de combinaciones en referencia a un péptido relacionado con glucagón de clase 2 que confieren propiedades mejoradas se puede aplicar individualmente o en combinación, por ejemplo, mayor actividad de GIP y/o actividad de GLP-1 pueden combinarse con el aumento de la semivida. En otras realizaciones relacionadas, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las modificaciones de aminoácido pueden ser sustituciones no conservativas, adiciones o deleciones. En algunas realizaciones, 1, 2, 3, 4, 5, 6 o más de las modificaciones de aminoácidos pueden ser sustituciones conservativas.

Modificaciones que afectan a la actividad de GIP

[0338] La actividad mejorada en el receptor de GIP es proporcionada por una modificación de aminoácidos en la posición 1. Por ejemplo, His en la posición 1 está sustituida con un aminoácido grande, aromático, 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 en la región correspondiente a los aminoácidos 12-29 proporciona un péptido relacionado con glucagón de Clase 2 que activa el receptor GIP, así como el receptor de GLP-1 y el receptor de glucagón. La estructura de hélice alfa puede ser estabilizada mediante, por ejemplo, la formación de un enlace covalente o puente intramolecular no covalente, o sustitución y/o inserción de aminoácidos en torno a las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizante de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido alfa, alfa disustituido).

[0339] La actividad mejorada en el receptor de GIP también es proporcionada por 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 sustituida con un aminoácido alifático grande, opcionalmente Leu, la Asn en la posición 28 está sustituido con un aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala, y la Thr en la posición 29 está sustituida con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly. La sustitución con LAG en las posiciones 27-29 proporciona una mayor actividad de GIP en relación a la secuencia natural MNT en esas posiciones.

[0340] La actividad mejorada en el receptor de GIP también es proporcionada por una modificación de aminoácidos en la posición 12. Por ejemplo, la posición 12 está sustituida con un aminoácido grande alifático no polar, opcionalmente Ile.

[0341] La actividad mejorada en el receptor de GIP también es proporcionada por 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 aminoácido alifático pequeño, opcionalmente Ala. Una sustitución con QA en las posiciones 17 y 18 proporciona mayor actividad de GIP en relación a la secuencia RR natural en esas posiciones.

[0342] El aumento de actividad en el receptor de GIP es proporcionado por las 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 de ejemplo, el puente es entre las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, 24 y 28, o 17 y 20. En otras realizaciones, las interacciones no covalentes, tales como puentes salinos, se pueden formar entre aminoácidos cargados positivamente y negativamente en estas posiciones.

[0343] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente que aumentan la actividad del receptor de GIP puede aplicarse individualmente o en combinación. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GIP generalmente proporcionan actividad de GIP más alta que cualquiera de tales modificaciones tomadas solas.

Modificaciones que afectan la actividad de glucagón

[0344] En algunas realizaciones, el aumento de potencia de glucagón se proporciona por una modificación de aminoácidos en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1001). A modo de ejemplo no limitativo, dicha potencia mejorada se puede proporcionar mediante la sustitución de la serina de origen 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 una 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 de glucagón conserva su selectividad original para el receptor de glucagón en relación a los receptores de GLP-1.

[0345] La actividad del receptor de glucagón se puede reducir mediante una modificación de aminoácidos en la posición 3, por ejemplo, sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 3, con un aminoácido básico, o hidrófobo. Por ejemplo, la sustitución en la posición 3 con ácido glutámico, ornitina, o norleucina reduce sustancialmente o destruye la actividad del receptor de glucagón.

[0346] La actividad mantenida o mejorada en el receptor de glucagón puede lograrse mediante la modificación de la Gln en la posición 3 con un análogo de glutamina, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1243-1248, 1250, 1251, y 1253 a 1256.

[0347] La restauración de la actividad de glucagón que se ha reducido por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y 2 es proporcionada por modificaciones que estabilizan la estructura de hélice alfa de la parte C-terminal (aminoácidos 12-29) del péptido de glucagón o análogo de este. 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 otras realizaciones, las interacciones no covalentes tales como puentes salinos se pueden formar entre los aminoácidos cargados positivamente y negativamente en estas posiciones. En aún otras realizaciones, uno o más aminoácidos alfa, alfa disustituidos son insertados o sustituidos en esta parte C-terminal (aminoácidos 12-29) en las posiciones que conservan la actividad deseada. Por ejemplo, una, dos, tres o todas las posiciones 16, 20, 21 o 24 están sustituidas con un aminoácido alfa, alfa disustituido, por ejemplo, Aib.

Modificaciones que afectan la actividad de GLP-1

[0348] 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.

[0349] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 también se proporciona mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (aproximadamente 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 en torno a las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido alfa, alfa disustituido), como se describe adicionalmente en el presente documento. En realizaciones de ejemplo, 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 la que $i = 12, 16, 20, \text{ o } 24$) están unidos entre sí y por lo tanto estabilizan la hélice alfa de glucagón. En algunas realizaciones, el puente o enlazador es de aproximadamente 8 (o cerca de 7-9) átomos de longitud, en particular cuando el puente está entre las posiciones i e $i + 4$. En algunas realizaciones, el puente o enlazador es de aproximadamente 6 (o aproximadamente 5-7) átomos de longitud, en particular cuando el puente está entre las posiciones j y $j + 3$.

[0350] En algunas realizaciones, los puentes intramoleculares están formados por (a) la sustitución de la serina de origen 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 una 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 y (b) la sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 20 por otro aminoácido hidrófilo que tiene una cadena lateral que está cargada o tiene una capacidad de enlace de hidrógeno, y es de al menos aproximadamente 5 (o aproximadamente 4-6) átomos en longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina o la ornitina. Las cadenas laterales de estos aminoácidos en las posiciones 16 y 20 pueden formar un puente salino o pueden estar unidos covalentemente. En algunas realizaciones, los dos aminoácidos están unidos entre sí para formar un anillo de lactama.

[0351] En algunas realizaciones, la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón se consigue a través de la formación de un puente intramolecular que no sea un puente de lactama. Por ejemplo, los procedimientos de unión covalente adecuados incluyen uno cualquiera o más de metátesis de olefinas, ciclación a base de lantionina, puente de disulfuro o la formación de puentes que contiene azufre modificado, el uso de grupos α, ω -diaminoalcano, formación de puentes de metal-átomo, y otros medios de ciclación de péptidos se utilizan para estabilizar la hélice alfa.

[0352] En otras realizaciones, uno o más aminoácidos alfa, alfa disustituidos se insertan o sustituyen en esta parte C-terminal (aminoácidos 12-29) en las 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 alfa, alfa disustituido, por ejemplo, Aib.

[0353] El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante una modificación de aminoácidos en la posición 20 tal como se describe en el presente documento.

[0354] El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se proporciona mediante la adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096) a C-terminal. La actividad de GLP-1 en tales análogos se puede aumentar más mediante la modificación del aminoácido en la posición 18, 28 o 29, o en la posición 18 y 29, tal como se describe en el presente documento.

[0355] Un aumento más modesto de la portencia de GLP-1 se proporciona mediante la modificación del aminoácido

en la posición 10 para ser un residuo de aminoácido grande aromático, opcionalmente Trp.

[0356] Se proporciona una actividad reducida en el receptor de GLP-1, por ejemplo, mediante una modificación de aminoácidos en la posición 7 como se describe en el presente documento.

[0357] La potencia en el receptor de GLP-1 se puede mejorar aún más por una sustitución de alanina por la arginina natural en la posición 18.

[0358] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a un péptido relacionado con glucagón de la Clase 2 que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 se pueden aplicar individualmente 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 descripción proporciona péptidos de glucagón que comprenden modificaciones en la posición 16, en la posición 20, y en el grupo de ácido carboxílico C-terminal, opcionalmente con un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20; péptidos de glucagón que comprenden modificaciones en la posición 16 y en el grupo de ácido carboxílico C-terminal; péptidos de 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 de glucagón que comprenden modificaciones en la posición 20 y en el grupo de ácido carboxílico C-terminal.

Modificaciones que mejoran la resistencia a DPP-IV

[0359] Las modificaciones en la posición 1 y/o 2 se pueden aumentar la resistencia del péptido a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP IV). Por ejemplo, la posición 1 y/o la posición 2 pueden estar sustituidos con un aminoácido resistente a DPP-IV como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 2 está sustituido con N-metil alanina.

[0360] 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 puede ser restaurada mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (aproximadamente los aminoácidos 12-29), por ejemplo, mediante la formación de un enlace covalente entre las cadenas laterales de dos aminoácidos, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlace covalente es entre los aminoácidos en las posiciones "i" y "i + 4", o posiciones de "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 de ejemplo, 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 un puente lactama, como se describe en el presente documento.

Modificaciones que reducen la degradación

[0361] En todavía otras realizaciones de ejemplo, cualquiera de los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 se puede 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 con el tiempo, especialmente en tampones ácidos o alcalinos. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace de péptido Asp15-Ser16. En otras realizaciones de ejemplo, la modificación de aminoácido en la posición 15 es una delección o sustitución de Asp con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. En otros ejemplos de realización, la modificación de aminoácido en la posición 16 es una delección o sustitución de Ser con Thr o Aib. En otras realizaciones de ejemplo, la Ser en la posición 16 está sustituida con ácido glutámico o con otro aminoácido cargado negativamente que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con una cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico.

[0362] En algunas realizaciones, el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido natural está modificado, por ejemplo por delección o sustitución. Tales modificaciones pueden prevenir la degradación oxidativa del péptido. En algunas realizaciones, la Met en la posición 27 se sustituye con leucina, isoleucina o norleucina. En algunas otras realizaciones específicas, Met en la posición 27 está sustituida con leucina o norleucina.

[0363] En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 está modificada, por ejemplo, por delección o sustitución. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln. En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 está sustituida con Ser, Thr, Ala o Aib. En algunas realizaciones, la Gln en la posición 20 y/o 24 está sustituida con Lys, Arg, Orn, o citrulina.

[0364] En algunas realizaciones, el Asp en la posición 21 está modificado, por ejemplo, por delección o sustitución. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar una succinimida cíclica intermedia seguido por isomerización a iso-aspartato. En algunas realizaciones, la posición 21 se sustituye con Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico. En algunas otras realizaciones específicas, la posición 21 se sustituye con Glu.

Estabilización de la estructura de hélice alfa

[0365] La estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido relacionado con glucagón de clase 2 (aproximadamente los aminoácidos 12-29) ofrece una mejor actividad GIP y/o GLP-1 y restaura la actividad del glucagón que se ha reducido por modificaciones de aminoácidos en las posiciones 1 y/o 2. La estructura de hélice alfa puede ser estabilizada mediante, por ejemplo, la formación de un enlace covalente o puente intramolecular no covalente, o sustitución y/o inserción de aminoácidos en torno a las posiciones 12-29 con un aminoácido estabilizador de hélice alfa (por ejemplo, un aminoácido alfa, alfa disustituido). La estabilización de la estructura de hélice alfa de un agonista de GIP puede llevarse a cabo como se describe en el presente documento.

Acilación y alquilación

[0366] Según algunas realizaciones, los péptidos similares al glucagón descritos en el presente documento están modificados para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo, por ejemplo, un grupo acilo o alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural tal como se describe en el presente documento. La acilación o alquilación pueden aumentar la semivida de los péptidos de glucagón en circulación. La acilación o alquilación pueden retrasar ventajosamente el inicio de acción y/o extender la duración de la acción en el glucagón y/o 1-GLP receptores y/o mejorar la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV y/o mejorar la solubilidad. Actividad en el glucagón y/o receptores de GLP-1 y/o de GIP del péptido de glucagón se puede mantener después de la acilación. En algunas realizaciones, la potencia de los péptidos similares al glucagón acilados es comparable a las versiones no acilada de los péptidos de glucagón. Los péptidos relacionados con glucagón de clase 2 pueden ser acilados o alquilados en la misma posición de aminoácido donde se une un resto hidrófilo, o en una posición de aminoácido diferente, como se describe en el presente documento.

[0367] En algunas realizaciones, la descripción proporciona un péptido de glucagón modificado para comprender un grupo acilo o un grupo alquilo unido covalentemente al aminoácido en la posición 10 del péptido de glucagón. El péptido de glucagón puede comprender adicionalmente un espaciador entre el aminoácido en la posición 10 del péptido de glucagón y el grupo grupo acilo o alquilo. En algunas realizaciones, el grupo acilo es un ácido graso o ácido biliar o sal del mismo, por ejemplo un ácido graso C4 a C30, un ácido graso C8 a C24, ácido cólico, un alquilo C4 a C30, un alquilo C8 a C24, o un grupo alquilo que comprende un resto de esteroides de un ácido biliar. El espaciador es cualquier resto con grupos reactivos adecuados para la unión de grupos acilo o alquilo. En realizaciones de ejemplo, el espaciador comprende un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un bifuncional hidrófilo, o un espaciador bifuncional hidrófobo. En algunas realizaciones, el espaciador se selecciona del grupo que consiste en: Trp, Glu, Asp, Cys y un espaciador que comprende $\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n(\text{CH}_2)_m\text{COOH}$, donde m es cualquier número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12. Tales péptidos de glucagón acilados o alquilados también pueden comprender además un resto hidrófilo, opcionalmente un polietilenglicol. Cualquiera de los péptidos de glucagón anteriores puede comprender dos grupos de acilo o dos grupos alquilo, o una combinación de los mismos.

Conjugados y fusiones

[0368] El agonista de GIP puede estar enlazado, opcionalmente a través de un enlace covalente y opcionalmente a través de un enlazador, a un resto de conjugado como se describe en el presente documento.

[0369] En otras realizaciones, el segundo péptido es XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096), en el que X se selecciona de uno de los 20 aminoácidos comunes, por ejemplo, ácido glutámico, ácido aspártico o glicina. En algunas realizaciones X representa un aminoácido, por ejemplo Cys, comprende que, además, un resto hidrófilo unido covalentemente a la cadena lateral de dicho aminoácido. Tales extensiones C-terminal mejorar la solubilidad y también puede mejorar GIP o actividad de GLP-1. En algunas otras realizaciones en el que el péptido de glucagón comprende además una extensión carboxi terminal, el aminoácido carboxi terminal de la extensión termina en un grupo amida o un grupo éster en lugar de un ácido carboxílico.

[0370] En algunas realizaciones, por ejemplo, en los péptidos de glucagón que comprenden la extensión C-terminal, la treonina en la posición 29 del péptido de glucagón natural se sustituye con una glicina. Por ejemplo, un péptido de tipo glucagón que tiene una sustitución de glicina por treonina en la posición 29 y que comprende la extensión C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) es cuatro veces más potente en el receptor de GLP-1 como el glucagón natural modificado para comprender el mismo C-terminal de extensión. Esta sustitución T29G se puede utilizar en conjunción con otras modificaciones descritas en la presente para mejorar la afinidad de los péptidos similares al glucagón para el receptor de GLP-1. Por ejemplo, la sustitución 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 adición de una cadena de PEG como se describe en el presente documento.

[0371] En algunas realizaciones, se añade un aminoácido a la C-terminal, y el aminoácido adicional se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico y glicina.

Modificaciones que potencian la solubilidad

[0372] En otra realización, la solubilidad de cualquiera de los péptidos similares al glucagón se puede mejorar mediante sustituciones de aminoácidos y/o adiciones que introducen un aminoácido cargado en la parte C-terminal del péptido, preferiblemente en una posición C-terminal para la posición 27 de la SEQ ID NO: 1001. Opcionalmente, uno, dos o tres aminoácidos cargados puede ser introducido dentro de la parte C-terminal, preferiblemente C-terminal en la posición 27. En algunas realizaciones, el aminoácido o aminoácidos naturales en las posiciones 28 y/o 29 están sustituidos con uno o dos aminoácidos cargados, y/o en una realización adicional de uno a tres aminoácidos cargados también se añaden a la C-terminal del péptido. En realizaciones de ejemplo, uno, dos o todos de los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En algunas realizaciones, la carga negativa (aminoácido ácido) es ácido aspártico o ácido glutámico.

[0373] Las modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservativas, se pueden hacer al péptido de glucagón que aún permita que se retenga la actividad de GIP (y, opcionalmente, la actividad de GLP-1 y/o actividad de glucagón).

Otras modificaciones

[0374] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a un péptido de Clase 2 que aumentan o disminuyen la actividad de GIP, que aumentan o disminuyen la actividad del receptor de glucagón, y que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 se puede aplicar de forma individual o en combinación. Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a un péptido relacionado con la clase de glucagón 2 también se pueden combinar con otras modificaciones que confieren otras propiedades deseables, tales como mayor solubilidad y/o estabilidad y/o duración de la acción, como se describe en el presente documento con respecto a la Clase 2 péptidos relacionados con glucagón. Alternativamente, cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente en referencia a la clase 2 glucagón péptidos relacionados se pueden combinar con otras modificaciones descritas en el presente documento en referencia a 2 péptidos relacionados con glucagón de clase que no afectan sustancialmente o estabilidad o actividad solubilidad. Modificaciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a:

(A) mejorar la solubilidad, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más Charged ácido (s) amino a la parte C-terminal de glucagón natural, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. Tal un aminoácido cargado se puede introducir mediante la sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido cargado, por ejemplo, en las posiciones 28 ó 29, o alternativamente mediante la adición de un aminoácido cargado, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En ejemplos de realización, uno, dos, tres o todos de los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todos de los aminoácidos cargados están cargados positivamente. Tales modificaciones aumentan la solubilidad, por ejemplo, proporcionar al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o mayor solubilidad relativa al glucagón natural a un pH dado entre aproximadamente 5,5 y 8, por ejemplo, , pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C.

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

(C) el aumento de solubilidad y/o duración de la acción o la semivida en circulación y/o retrasar el comienzo de la acción por acilación o alquilación del péptido de glucagón, como se describe en el presente documento;

(D) Aumento de la duración de la acción o la semivida en circulación a través de la introducción de la resistencia a la dipeptidil peptidasa IV de escisión (DPP IV) por modificación del aminoácido en la posición 1 o 2 como se describe en el presente documento.

(E) El aumento de la estabilidad por modificación de la Asp en la posición 15, por ejemplo, por delección o sustitución con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. Tales modificaciones pueden reducir la degradación o la escisión en un pH dentro del intervalo de 5,5 a 8, por ejemplo, retener al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%, hasta 100% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Tales modificaciones reducen la escisión del enlace peptídico entre Asp15-Ser16.

(F) El aumento de la estabilidad por modificación de la Ser en la posición 16, por ejemplo por sustitución con Thr o Aib. Tales modificaciones también reducen la escisión del enlace peptídico entre Asp15-Ser16.

(G) El aumento de la estabilidad por modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, por sustitución con leucina o norleucina. Tales modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa. La estabilidad también se puede aumentar mediante modificación de la Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, por 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 puede aumentarse mediante la modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, por sustitución con Glu. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar una succinimida intermedio cíclico seguido por isomerización a iso-aspartato.

(H) sustituciones no conservativa o conservativa, adiciones o delecciones que no afectan sustancialmente la actividad, por ejemplo, sustituciones conservativas en uno o más de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29; sustitución de uno o más de estas posiciones con Ala; delección de los aminoácidos en uno o más de las posiciones 27, 28 o 29; o delección de aminoácido 29 combinado opcionalmente con una amida C-terminal o éster en lugar del grupo de ácido carboxílico C-terminal; sustitución de Lys en la posición 12 con Arg; sustitución de Tyr en la posición 10 con Val o Phe;

[0375] La preservación de la actividad después de la pegilación es proporcionado por la adición de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) a la C-terminal.

5 **[0376]** Algunas posiciones del péptido de glucagón natural pueden ser modificados al tiempo que conserva al menos algunas de las actividades de péptido precursor. Según ello, los solicitantes prevén que uno o más de los aminoácidos localizados en las posiciones 2, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 puede ser sustituido con un aminoácido diferente de la presente en el péptido de tipo glucagón natural, y todavía retener la actividad en el receptor de glucagón.

10 **[0377]** En algunas realizaciones, la posición 18 está sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Ser, o Thr. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 20 se sustituye con Ser, Thr, Lys, Arg, Orn, citrulina o Aib. En algunas realizaciones, la posición 21 se sustituye con Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende de 1 a 10 modificaciones de aminoácidos seleccionadas de las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29. En realizaciones de ejemplo, las modificaciones son una o más sustituciones de aminoácidos seleccionado del grupo que consiste en Gln17, Ala18, Glu21, Ile23, Ala24, Val27 y Gly29. En algunas realizaciones, los ácidos 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-26 difieren del péptido precursor. En otras realizaciones, los ácidos 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-22 difieren del péptido precursor. En aún otras realizaciones, las modificaciones son Gln17, Ala18, Glu21, Ile23 y Ala24.

15 **[0378]** En algunas realizaciones, uno o más aminoácidos se añade a la terminal carboxi del péptido de glucagón. El aminoácido es típicamente seleccionado de uno de los 20 aminoácidos comunes, y en algunas realizaciones el aminoácido tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido natural. En realizaciones de ejemplo del aminoácido añadido se selecciona entre el grupo constituido por ácido glutámico y ácido aspártico y glicina.

20 **[0379]** *Otras modificaciones que no destruyen la actividad incluyen W10 o R20.*

25 **[0380]** En algunas realizaciones, los 2 péptidos relacionados con glucagón Clase descritos en el presente documento son modificados por el truncamiento de la C-terminal por uno o dos residuos de aminoácidos todavía retener la actividad y potencia similar al glucagón, receptores de GLP-1 y/o de GIP. En este sentido, el aminoácido en la posición 29 y/o 28 se puede eliminar.

Realizaciones de ejemplo

35 **[0381]** Según algunas realizaciones de la invención, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad agonista GIP comprende SEQ ID NO: 1001 con (a) una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP, (b) una modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa de la parte C-terminal (aminoácidos 12-29) de la analógica, y (c) opcionalmente, de 1 a 10 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10) más modificaciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, las exposiciones analógicas al menos actividad sobre el 1% de GIP natural en el receptor de GIP o cualquier otro nivel de actividad en el receptor GIP se describe en el presente documento.

40 **[0382]** 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 el presente 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 tal como se describe en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas de puentes de lactama en la sección "estabilización de la estructura de hélice alfa." Por ejemplo, el puente de lactama puede ser uno que se encuentra 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 $j + 3$, en el que i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que j es 17. en ciertas realizaciones, el puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, en el que 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.

45 **[0383]** En realizaciones alternativas, la modificación que estabiliza la estructura de hélice alfa es la introducción de uno, dos, tres, o cuatro alfa, alfa aminoácidos disustituídos en la posición (s) 16, 20, 21, y 24 de la analógica. En algunas realizaciones, el ácido alfa, alfa disustituída amino es Aib. En ciertos aspectos, la aminoácido alfa, alfa disustituído (por ejemplo, Aib) es en la posición 20 y la atPosition aminoácido 16 está sustituido con un aminoácido-carga positiva, tal 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 2,4-diaminobutírico ácido (Dab).

50 **[0384]** En aspectos específicos de la descripción, la modificación de aminoácido en la posición 1 es una sustitución de His con un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol, por ejemplo, un aminoácido aromático grande (por ejemplo, Tyr).

65

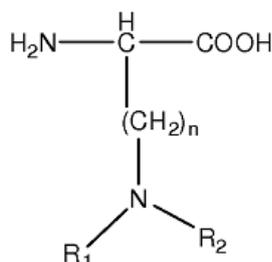
- 5 **[0385]** En ciertos aspectos, el análogo de glucagón comprende modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29. Por ejemplo, la Met en la posición 27 puede estar sustituido con un gran aminoácido alifático, opcionalmente Leu, la Asn en la posición 28 puede estar sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Ala, la Thr en la posición 29 puede estar sustituido 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.
- 10 **[0386]** 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 del glucagón puede comprender una extensión de que 1-6 aminoácidos de la extensión son los aminoácidos de carga positiva. Los aminoácidos de carga positiva pueden ser aminoácidos de fórmula IV, incluyendo, pero no limitado a Lys, HomoLys, Orn, y Dab.
- 15 **[0387]** 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 adicional o alternativamente ser modificado para comprender un resto hidrófilo tal como se describe adicionalmente en el presente documento. Además, en algunas otras realizaciones, el análogo comprende uno cualquiera o una combinación de las siguientes modificaciones:
- 20 (a) Ser en la posición 2 sustituido con D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, Aib, Val, o el ácido alfa-amino-N-butiárico;
 (b) Tyr en la posición 10 sustituido con Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
 (c) Unión de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;
 (d) Lys en la posición 12 sustituido con Arg o Ile;
 25 (e) Ser en la posición 16 sustituido con Glu, Gln, ácido homoglutiámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o Aib;
 (f) Arg en la posición 17 sustituido con Gln;
 (g) Arg en la posición 18 sustituido con Ala, Ser, Thr, o Gly;
 (h) Gln en la posición 20 sustituido con Ser, Thr, Ala, Lys, citrulina, Arg, Orn, o Aib;
 (i) Asp en la posición 21 sustituido con Glu, ácido homoglutiámico, ácido homocisteico;
 30 (j) Val en la posición 23 sustituido con Ile;
 (k) Gln en la posición 24 sustituido con Asn, Ser, Thr, Ala, o Aib;
 (l) y una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, y 29.
- 35 **[0388]** En realizaciones de ejemplo, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad de GIP agonista comprende las siguientes modificaciones:
- (a) una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista 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 $j + 3$, en el que i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que j es 17,
 40 modificaciones (c) 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 de aminoácidos adicionales, y la EC_{50} del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.
- 45 **[0389]** El puente de lactama del análogo de estas realizaciones puede ser un puente de lactama tal como se describe en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas de puentes de lactama en la sección "estabilización de la estructura de hélice alfa." Por ejemplo, el puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, en el que 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.
- 50 **[0390]** Según estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1005-1094.
- 55 **[0391]** En otros ejemplos de realización, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad de GIP agonista comprende las siguientes modificaciones:
- (a) una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP,
 (b) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo está sustituido con un alfa, alfa amino disustituido ácido,
 60 modificaciones (c) 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 más modificaciones de aminoácidos, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos adicionales, y la EC_{50} del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.
- 65 **[0392]** El aminoácido alfa, alfa disustituido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier aminoácido alfa,

alfa disustituido, incluyendo ácido amino iso-butírico (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-aminocyclooctane-1-carboxílico). En ciertas realizaciones, el ácido alfa, alfa disustituida amino es Aib. En ciertas realizaciones, el aminoácido en la posición 20 está sustituido con un alfa, alfa aminoácido disustituida, por ejemplo, Aib.

[0393] Según estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1099-1141, 1144-1164, 1166-1169, y 1173-1178.

[0394] En aún otros ejemplos de realización, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad de GIP agonista comprende las siguientes modificaciones:

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



[Fórmula IV],

en la que n es de 1 a 16, o de 1 a 10, o de 1 a 7, o de 1 a 6, o 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 alquilo) NH₂, (alquilo C₁-C₁₈) SH, (alquilo C₀-C₄) (C₃-C₆) cicloalquilo, (alquilo C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (alquilo C₀-C₄) (C₆-C₁₀ arilo) R₇, y (alquilo C₁-C₄) (heteroarilo C₃-C₉), en el que R₇ es H o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre,

(c) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 con un alfa, amino ácido alfa-disustituido, modificaciones (d) de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29, por ejemplo, modificaciones de aminoácidos en posición 27 y/o 28, y

(e) 1-9 o 1-6 más modificaciones de aminoácidos, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 modificaciones de aminoácidos adicionales, y la EC₅₀ del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

[0395] 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.

[0396] La alfa, alfa-disustituido amino ácido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier alfa, aminoácido-alfa disustituido, incluyendo ácido amino iso-butírico (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-aminocyclooctane-1-carboxílico). En ciertas realizaciones, el ácido alfa, alfa amino-disustituido es Aib.

[0397] Según estas realizaciones, el análogo puede comprender, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1099-1165.

[0398] En aún otros ejemplos de realización, el análogo del glucagón (SEQ ID NO: 1001) que tiene actividad agonista GIP comprende:

- (a) una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP, y
 (b) una extensión de unos 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal para el aminoácido en la posición 29, en el que al menos uno de los aminoácidos de la extensión es acilado o alquilado, en el que la EC₅₀ del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

[0399] 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, o HomoLys. También, en algunas otras 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), en donde X es cualquier aminoácido, o GPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID NO: 1171) o XGPSSGAPPPSK (SEQ ID NO: 1172), en el que X es Gly o una pequeña, alifáticos o no polar o ligeramente polar aminoácido. En algunas realizaciones, las aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservativas 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-terminal extendido-C. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 del análogo de C-terminal extendida.

5 **[0400]** En algunas realizaciones, el análogo que tiene actividad agonista de GIP comprende además 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.

10 **[0401]** En cualquiera de las realizaciones de ejemplo anteriores, la modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP puede ser una sustitución de Su con un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. La modificación de aminoácido en la posición 1 puede, por ejemplo, ser una sustitución de Su con un aminoácido grande, aromático. En algunas realizaciones, la gran aminoácido, aromático es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Tyr.

15 **[0402]** En ciertos aspectos, el análogo no comprende una modificación de aminoácidos en la posición 1 que la modificación confiere actividad agonista de GIP. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 1 no es un ácido grande, aromático amino, por ejemplo, Tyr. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 1 es un aminoácido que comprende un anillo de imidazol, por ejemplo, Su, análogos de Su. En ciertas realizaciones, el análogo no es cualquiera de los compuestos descritos en la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO
20 **[0403]** Además, con respecto a las realizaciones de ejemplo anteriores, las 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, la Met en la posición 27 puede estar sustituido con un gran aminoácido alifático, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 puede estar sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Ala, y/o la Thr en la posición 29 puede estar sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly. Alternativamente, el análogo puede comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

25 **[0404]** El análogo de las realizaciones de ejemplo anteriores 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, tal como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento que aumentar o disminuir la actividad en cualquiera de los GIP, receptores de GLP-1, y el glucagón, mejorar la solubilidad, mejorar la duración de la acción o la semivida en circulación, retrasar 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, la sustitución opcionalmente 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 conservativas con respecto a SEQ ID NO: 1095 o 1096, a la C-terminal. El análogo puede comprender uno o más de las siguientes modificaciones:

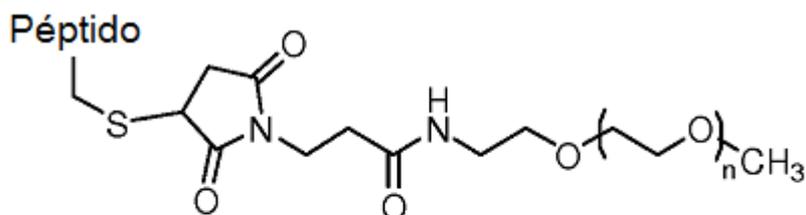
30 (i) Ser en la posición 2 sustituido con D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, Aib, Val, o alfa-amino-N- ácido butírico;
35 (ii) Tyr en la posición 10 sustituido con Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
(iii) La unión de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;
40 (iv) Lys en la posición 12 sustituido con Arg;
(v) Ser en la posición 16 sustituido con Glu, Gln, ácido homocisteico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o Aib;
(vi) Arg en la posición 17 sustituido con Gln;
(vii) Arg en la posición 18 sustituido con Ala, Ser, Thr, o Gly;
(viii) Gln en la posición 20 sustituido con Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o Aib;
45 (ix) Asp en la posición 21 sustituido con Glu, ácido homocisteico, ácido homocisteico;
(x) Val en la posición 23 sustituido con Ile;
(xi) Gln en la posición 24 sustituido con Asn, Ala, Ser, Thr, o Aib; y
(xii) una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20,
50 21, 24, 27, 28, y 29.

55 **[0405]** El análogo en algunas otras realizaciones comprenden una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln con Glu), donde el análogo tiene menos de 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos 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), en el que el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

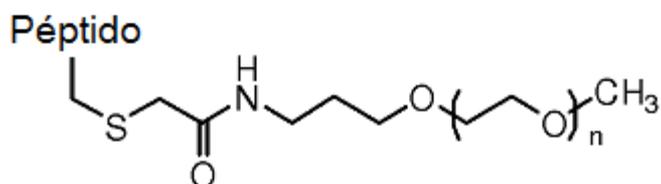
60 **[0406]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede ser unido covalentemente a un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente a la fracción hidrófila en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, o el C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo
65

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, tal que el resto hidrófilo está unido covalentemente al análogo a posición 40.

- 5 **[0407]** 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 puede ser un aminoácido que es natural de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1001) o puede ser un aminoácido que está sustituyendo un aminoácido natural de la SEQ ID NO : 1001. En algunas otras realizaciones, en el que el resto hidrófilo está unido a una Cys, la unión con el resto hidrófilo puede comprender la estructura



o



- 35 **[0408]** Con respecto a los análogos que comprenden un resto hidrófilo, el resto hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección "La unión de restos hidrófilos." En algunas realizaciones, el resto hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, por ejemplo, aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

- 40 **[0409]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede comprender un aminoácido modificado en el que la cadena lateral está covalentemente unido a un grupo acilo o alquilo (por ejemplo, un grupo acilo o alquilo que es no natural a un origen natural aminoácidos). El análogo acilado o alquilado puede estar según los péptidos acilados o alquilados descritos en la sección "acilación y alquilación." En algunas realizaciones, el grupo acilo es un C₄ a un grupo acilo graso C₃₀, tal como, por ejemplo, un grupo acilo graso C₁₀ o alquilo, un grupo acilo graso C₁₂ o alquilo, un grupo acilo graso C₁₄ o alquilo, un grupo acilo graso C₁₆ o alquilo, un grupo acilo graso C₁₈ o alquilo, un grupo acilo graso C₂₀ o alquilo, un grupo acilo C₂₂ o alquilo. El grupo acilo o alquilo puede estar unido covalentemente a cualquier aminoácido de la analógica, incluyendo el aminoácido en la posición 10 o 40, o el aminoácido 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 grupo acilo o alquilo, tal que el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente al análogo en la posición 40. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido de Fórmula I, II, o III, por ejemplo, un residuo de Lys. El grupo acilo o alquilo puede estar unido covalentemente a un aminoácido que es natural de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1001) o puede estar ligado a un aminoácido que se añade a la secuencia de SEQ ID NO: 1001 o a la secuencia de SEQ ID NO: 1001 seguido por la SEQ ID NO: 1095 (en el N o C-terminal) o puede estar unido a un aminoácido que sustituye a un aminoácido natural, por ejemplo, la Tyr en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1001 .

- 60 **[0410]** En las realizaciones de ejemplo anteriores, en el que el análogo comprende un grupo acilo o alquilo, el análogo puede estar unido al grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, tal como se describe en el presente documento.

- 65 **[0411]** El espaciador, por ejemplo, puede ser de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, 6-amino hexanoico, cualquier aminoácido descrito en el presente documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala, beta Ala-beta Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, gamma Glu-gamma 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

está gamma Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es gamma -Glu- gamma Glu.

[0412] En otras realizaciones adicionales a modo de ejemplo, el análogo del glucagón que tienen actividad agonista de GIP comprende la secuencia de aminoácidos según una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1227, 1228, 1229 o 1230 que comprende además las siguientes modificaciones:

- (a) opcionalmente, una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP,
- (b) una extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos C-terminal para el aminoácido en la posición 29, en el que al menos uno de los aminoácidos de la extensión se acila o alquilado, y
- (d) hasta 6 modificaciones de aminoácidos adicionales, en el que la EC₅₀ del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

[0413] 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, o HomoLys. También, en algunas otras realizaciones, los aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1095) o XGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1096), en donde X es cualquier aminoácido, o GPSSGAPPPK (SEQ ID nO: 1170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID nO: 1171) o XGPSSGAPPPSK (SEQ ID nO: 1172), en el que X es Gly o una pequeña, alifáticos o aminoácido no polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones, las aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o más sustituciones conservativas 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-terminal extendido-C. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 del análogo de C-terminal extendida.

[0414] En cualquiera de las realizaciones de ejemplo anteriores, el aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP puede ser un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. El aminoácido en la posición 1 puede, por ejemplo, ser un aminoácido grande, aromático. En algunas realizaciones, la gran aminoácido, aromático es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Tyr.

[0415] El análogo de las realizaciones de ejemplo anteriores puede comprender además 1-6 modificaciones de aminoácidos adicionales, 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, mejorar la solubilidad, mejorar la duración de la acción o la semivida en circulación, retrasar la aparición de la acción, o aumentar la estabilidad.

[0416] En ciertos aspectos, análogos de glucagón descritos en el ejemplo de realización anterior, comprenden, además, modificaciones de aminoácidos en una, dos o todas las posiciones 27, 28 y 29. Modificaciones en estas posiciones puede ser cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento en relación con estas posiciones. Por ejemplo, con respecto a SEQ ID NO: 1227, 1228, 1229 o 1230, la posición 27 puede estar sustituido con un gran aminoácido alifático (por ejemplo, Leu, Ile o norleucina) o Met, la posición 28 puede ser sustituido con otro pequeño amino alifático ácido (por ejemplo, Gly o Ala) o Asn, y/o la posición 29 se pueden sustituir con otro pequeño aminoácido alifático (por ejemplo, Ala o Gly) o Thr. Alternativamente, el análogo puede comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

[0417] El análogo puede comprender además una o más de las siguientes modificaciones adicionales:

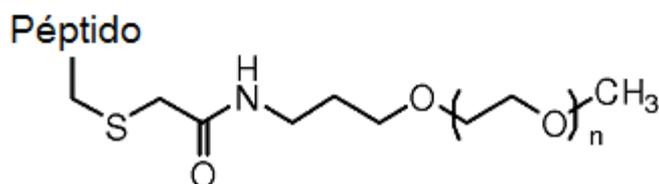
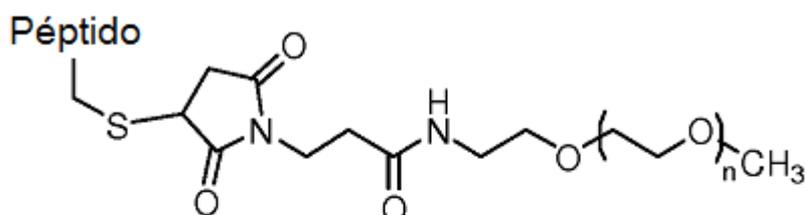
- (i) el aminoácido en la posición 2 es uno cualquiera de D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, Aib, Val, o alfa-amino-N-butírico;
- (ii) el aminoácido en la posición 10 es Tyr, Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
- (iii) la unión de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;
- (iv) el aminoácido en la posición 12 es Ile, Lys o Arg;
- (v) el aminoácido en la posición 16 es uno cualquiera de Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o Aib;
- (vi) el aminoácido en la posición 17 es Gln o Arg;
- (vii) el aminoácido en la posición 18 es uno cualquiera de Ala, Arg, Ser, Thr, o Gly;
- (viii) el aminoácido en la posición 20 es uno cualquiera de Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o Aib o otra alfa, aminoácido-alfa disustituido;
- (ix) el aminoácido en la posición 21 es uno cualquiera de Glu, Asp, ácido homoglutámico, ácido homocisteico;
- (x) el aminoácido en la posición 23 es Val o Ile;
- (xi) el aminoácido en la posición 24 es uno cualquiera de Gln, Asn, Ala, Ser, Thr, o Aib; y
- (xii) una o más sustituciones conservativas 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.

[0418] El análogo en algunas otras realizaciones comprenden una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln con Glu), donde el análogo tiene menos de 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos 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), en el que el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

5 **[0419]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede ser unido covalentemente a un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente a la fracción hidrófila en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, o el C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende un resto hidrófilo unido covalentemente al análogo en la posición 24.

10 **[0420]** 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 puede ser un aminoácido que es natural de la SEQ ID NO: 1001, 1227, 1228, 1229 o 1230 o puede ser un aminoácido sustituido. En algunas otras realizaciones, en el que el resto hidrófilo está unido a un Cys, la articulación puede comprender la estructura



35 **[0421]** Con respecto a los análogos que comprenden un resto hidrófilo, el resto hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección "La unión de restos hidrófilos." En algunas realizaciones, el resto hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, por ejemplo, aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

40 **[0422]** Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede comprender un aminoácido modificado dentro de la extensión C-terminal en la que la cadena lateral está covalentemente unido a un grupo acilo o alquilo. El análogo acilado o alquilado puede estar según los péptidos acilados o alquilados descritos en la sección "acilación y alquilación." En algunas realizaciones, el grupo acilo es un C4 a un grupo acilo graso C30, tal como, por ejemplo, un grupo acilo graso C10 o alquilo, un grupo acilo graso C12 o alquilo, un grupo acilo graso C14 o alquilo, un grupo acilo graso C16 acilo o un grupo alquilo, un grupo acilo graso C18 o alquilo, un grupo acilo o un grupo alquilo C20, o un grupo acilo C22 o alquilo. El grupo acilo o alquilo puede estar unido covalentemente a cualquier aminoácido de la analógica, incluyendo el aminoácido en la posición 10 o 40, o el aminoácido C-terminal. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido de Fórmula I, II, o III, por ejemplo, un residuo de Lys. El grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a un aminoácido que es natural de la SEQ ID NO: 1001, 1227, 1228, 1229 o 1230 o puede estar ligado a un aminoácido sustituido. El grupo acilo o alquilo está unido covalentemente a un aminoácido que es natural de la SEQ ID NO: 1095, 1096, 1171 o 1172, o puede estar ligado a un aminoácido sustituido.

45 **[0423]** En las realizaciones de ejemplo anteriores, en el que el análogo comprende un grupo acilo o alquilo, el análogo puede estar unido al grupo acilo o alquilo a través de un espaciador, tal como se describe en el presente documento. El espaciador, por ejemplo, puede ser de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un aminoácido (por ejemplo, 6-amino hexanoico, cualquier aminoácido descrito en el presente documento), un dipéptido (por ejemplo, Ala-Ala, beta Ala-beta Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, gamma Glu-gamma 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 está gamma Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es gamma-Glu- gamma Glu.

60 **[0424]** En algunas realizaciones muy específicas, un análogo de la invención 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 SEQ ID NOs: 1167-1169, 1173-1178 y 1225.

5 **[0425]** Además, los ejemplos específicos de análogos de la descripción incluyen cualquiera de los que se hace referencia en las Tablas 1-3.

10 **[0426]** En otras realizaciones adicionales a modo de ejemplo, el análogo del glucagón que tienen actividad agonista de GIP comprende un grupo acilo o alquilo (por ejemplo, un grupo acilo o alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural), en el que el grupo acilo o 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 1 a 21 aminoácidos C-terminal para el aminoácido en la posición 29 y el espaciador está unido a la cadena lateral de un aminoácido que corresponde a una de las posiciones 37-43 comparación con la SEQ ID NO: 1001, en el que la EC₅₀ del análogo para la activación del receptor de GIP es de aproximadamente 10 nM o menos.

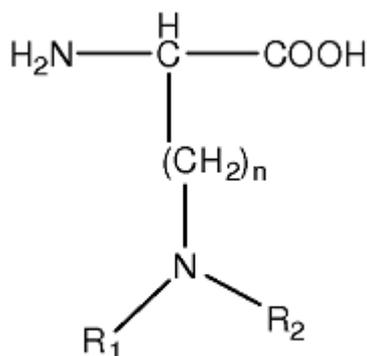
15 **[0427]** En tales realizaciones, el análogo puede comprender una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1001 con (i) una modificación de aminoácidos en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP, (ii) modificaciones de aminoácidos en uno, dos, o todas las posiciones 27, 28, y 29, (iii) al menos uno de:

20 (a) el análogo comprende 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 las posiciones j y j + 3, en el que i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en el que j es 17;

(B) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21 y 24 del análogo está sustituido con un alfa, alfa amino disustituida ácido; o

(C) los comprende analógicas (i) una sustitución de aminoácidos de Ser en la posición 16 con un aminoácido de fórmula IV:

25



30

35

40

[Fórmula IV],

45 en la que n es de 1 a 7, en donde 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 o OH, y la cadena lateral del aminoácido de Fórmula IV comprende un grupo amino libre; y (ii) una sustitución de aminoácido de la Gln en la posición 20 con un aminoácido alfa,alfa-disustituido.

50 y (iv) hasta 6 modificaciones de aminoácidos adicionales.

55 **[0428]** La alfa, alfa-disustituido amino ácido del análogo de estas realizaciones puede ser cualquier alfa, aminoácido-alfa disustituido, incluyendo ácido amino iso-butírico (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-aminocyclooctane-1-carboxílico). En ciertas realizaciones, el ácido alfa, alfa amino-disustituido es Aib.

60 **[0429]** 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.

65 **[0430]** En cualquiera de las realizaciones de ejemplo anteriores, la modificación de aminoácido en la posición 1 que confiere actividad agonista GIP puede ser una sustitución de Su con un aminoácido que carece de una cadena lateral de imidazol. La modificación de aminoácido en la posición 1 puede, por ejemplo, ser una sustitución de Su con un aminoácido grande, aromático. En algunas realizaciones, la gran aminoácido, aromático es cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, Tyr.

[0431] Además, con respecto a las realizaciones de ejemplo anteriores, las 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, la Met en la posición 27 puede estar sustituido con un gran aminoácido alifático, opcionalmente Leu, el Asn en la posición 28 puede estar sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Ala, y/o la Thr en la posición 29 puede estar sustituido con un pequeño aminoácido alifático, opcionalmente Gly. Alternativamente, el análogo puede comprender tales modificaciones de aminoácidos en la posición 27 y/o 28.

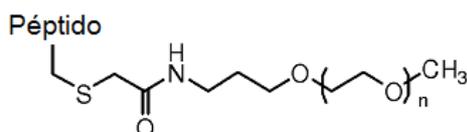
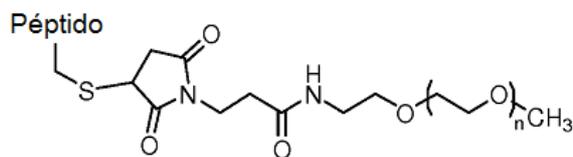
[0432] El análogo de las realizaciones de ejemplo anteriores pueden comprender además 1-9 o 1-6 Además, modificaciones de aminoácidos adicionales, por ejemplo 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 más modificaciones de aminoácidos, tal como, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento que aumentar o disminuir la actividad en cualquiera de los GIP, receptores de GLP-1, y el glucagón, mejorar la solubilidad, mejorar la duración de la acción o la semivida en circulación, retrasar 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, la sustitución opcionalmente 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 conservativas con respecto a SEQ ID NO: 1095 o 1096, a la C-terminal. El análogo puede comprender uno o más de las siguientes modificaciones:

- (i) Ser en la posición 2 sustituido con D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, Aib, Val, o alfa-amino-N-ácido butírico;
- (ii) Tyr en la posición 10 sustituido con Trp, Lys, Orn, Glu, Phe, o Val;
- (iii) La unión de un grupo acilo a un Lys en la posición 10;
- (iv) Lys en la posición 12 sustituido con Arg;
- (v) Ser en la posición 16 sustituido con Glu, Gln, ácido homocisteico, ácido homocisteico, Thr, Gly, Lys, o Aib;
- (vi) Arg en la posición 17 sustituido con Gln;
- (vii) Arg en la posición 18 sustituido con Ala, Ser, Thr, o Gly;
- (viii) Gln en la posición 20 sustituido con Ala, Ser, Thr, Lys, citrulina, Arg, Orn, o Aib;
- (ix) Asp en la posición 21 sustituido con Glu, ácido homocisteico, ácido homocisteico;
- (x) Val en la posición 23 sustituido con Ile;
- (xi) Gln en la posición 24 sustituido con Asn, Ala, Ser, Thr, o Aib; y
- (xii) una sustitución conservativa 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.

[0433] El análogo en algunas otras realizaciones comprenden una combinación de las modificaciones (i) a (xii). Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos en la posición 3 (por ejemplo, una sustitución de aminoácido de Gln con Glu), donde el análogo tiene menos de 1% de la actividad del glucagón en el receptor de glucagón. Alternativa o adicionalmente, el análogo puede comprender una modificación de aminoácidos 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), una delección de aminoácido (s)C-terminal para el aminoácido en la posición 27 o 28, produciendo un péptido ácido 27- o 28-amino, o una combinación de los mismos, donde el análogo tiene menos de aproximadamente 10% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

[0434] Con respecto a las realizaciones de ejemplo, el análogo puede ser unido covalentemente a un resto hidrófilo. En algunas realizaciones, el análogo se une covalentemente a la fracción hidrófila en cualquiera de las posiciones de aminoácidos 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40, o el 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, tal que el resto hidrófilo está unido covalentemente al análogo a posición 40.

[0435] 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 puede ser un aminoácido que es natural de la secuencia de glucagón (SEQ ID NO: 1001) o puede ser un aminoácido que está sustituyendo un aminoácido natural de la SEQ ID NO : 1001. En algunas otras realizaciones, en el que el resto hidrófilo está unido a una Cys, la unión con el resto hidrófilo puede comprender la estructura (ver diagramm) o (véase diagramm)



20 [0436] Con respecto a los análogos que comprenden un resto hidrófilo, el resto hidrófilo puede ser cualquiera de los
descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección "La unión de restos
hidrófilos." En algunas realizaciones, el resto hidrófilo es un polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones
25 tiene un peso molecular de aproximadamente 1.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons, por ejemplo,
aproximadamente 20.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0437] En las realizaciones de ejemplo, en el que el análogo comprende un grupo acilo o alquilo, que está unido a la
analogía a través de un espaciador, el espaciador puede ser cualquier espaciador como se describe en el presente
documento. El espaciador, por ejemplo, puede ser de 3 a 10 átomos de longitud y puede ser, por ejemplo, un
30 aminoácido (por ejemplo, 6-amino hexanoico, cualquier aminoácido descrito en el presente documento), un dipéptido
(por ejemplo, Ala-Ala, beta Ala-beta Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, gamma Glu-gamma 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
35 está gamma Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es gamma -Glu- gamma Glu.

[0438] El grupo acilo o alquilo es cualquier grupo acilo o alquilo tal como se describe en el presente documento, tal
como un grupo acilo o alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural. 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
40 alquilo o acilo graso C18, un grupo alquilo o acilo graso C20, o un grupo alquilo o acilo graso C22, o un grupo alquilo
o acilo graso C30. En realizaciones específicas, el grupo acilo es un grupo acilo graso C12 a C18 (por ejemplo, un
grupo acilo graso C14 o C16).

[0439] En algunas realizaciones, la extensión de aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos 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), en donde X es cualquier aminoácido, o
GPSSGAPPPK (SEQ ID nO: 1170) o XGPSSGAPPPK (SEQ ID nO: 1171) o XGPSSGAPPPSK (SEQ ID nO: 1172),
en el que X es Gly o una pequeña, alifáticos o no aminoácido -polar o ligeramente polar. En algunas realizaciones,
50 las aproximadamente 1 a aproximadamente 21 aminoácidos pueden comprender secuencias que contienen una o
más sustituciones conservativas 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-
terminal extendido-C. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 del
análogo de C-terminal extendida.

[0440] El agonista GIP 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
modificaciones adicionales que retener la actividad agonista de GIP. En ciertas realizaciones, el agonista de GIP
comprende los aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1099-1275.

60 Péptidos relacionados con glucagón de la clase 3

[0441] En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón es un péptido relacionado con glucagón de la
clase 3, que se describe en el presente documento y en la solicitud de patente internacional Nos. WO 2009/155258,
WO 2008/101017 y la solicitud provisional US No. 61/288.248 (presentada el 18 de diciembre de 2009).

65 [0442] Algunas de las secuencias biológicas que se hace referencia en la sección siguiente (SEQ ID NOs: 1 a 656),

relativa a 3 péptidos relacionados con glucagón clase son corresponden a SEQ ID NOs: 1 a 656 en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2009/155258.

Actividad

[0443] El péptido relacionado con glucagón 3 clase puede ser un péptido que muestra una mayor actividad en el receptor de glucagón, y en otras realizaciones, además, muestra una mayor estabilidad biofísica y/o solubilidad acuosa. Además, en algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón 3 Clase ha perdido selectividad de glucagón natural para el receptor de glucagón versus el receptor de GLP-1, y por lo tanto representa CO-agonistas de esos dos receptores. modificaciones de aminoácidos seleccionada dentro del péptido relacionado con glucagón 3 Clase pueden controlar la actividad relativa del péptido en el receptor de GLP-1 versus el receptor de glucagón. Por lo tanto, el péptido relacionado con 3 glucagón clase puede ser un/GLP-1 co-agonista de glucagón que tiene mayor actividad en el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1, un glucagón/GLP-1 co-agonista que tiene actividad aproximadamente equivalente a tanto receptores, o una de glucagón/GLP-1 co-agonista que tiene mayor actividad en el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón. La última categoría de co-agonista puede diseñarse para mostrar poca o ninguna actividad en el receptor de glucagón, y sin embargo conservar capacidad para activar el receptor de GLP-1 con la misma o mejor potencia que la de GLP-1 natural. Cualquiera de estos co-agonistas también pueden incluir modificaciones que confieren mayor estabilidad biofísica y/o solubilidad acuosa.

[0444] Las modificaciones del péptido relacionado con 3 glucagón clase se pueden hacer para producir un péptido de tipo glucagón que tiene en cualquier lugar de al menos aproximadamente 1% (incluyendo al menos aproximadamente 1,5%, 2%, 5%, 7%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175%) a aproximadamente 200% o más actividad en la GLP-1 receptor con respecto al GLP-1 natural y en cualquier lugar a partir de al menos aproximadamente 1% (incluyendo aproximadamente 1,5%, 2%, 5%, 7%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 100%, 125%, 150%, 175 %, 200%, 250%, 300%, 350%, 400%, 450%) a aproximadamente 500% o más actividad en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural. La secuencia de aminoácidos del glucagón natural es la SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-36) amida es SEQ ID NO: 52, y la secuencia de aminoácidos de GLP-1 (7-37) ácido es la SEQ ID NO: 50. en realizaciones de ejemplo, un péptido relacionado con glucagón de la clase 3 puede mostrar al menos 10% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón y al menos 50% de la actividad de GLP-1 natural en el GLP 1 receptor, o al menos 40% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón y al menos 40% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, o al menos 60% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón y al menos 60% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

[0445] La selectividad de un péptido relacionado con glucagón de clase 3 para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1 puede ser descrito como la relación relativa de glucagón/GLP-1 actividad (actividad del péptido en el receptor de glucagón en relación con el glucagón natural, dividido por la actividad del péptido en el GLP-1 receptor con respecto al GLP-1 natural). Por ejemplo, un péptido relacionado con glucagón de la clase 3 que muestra 60% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón y 60% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 tiene una relación 1: 1 de glucagón/GLP actividad -1. Las proporciones de ejemplo de glucagón/GLP-1 actividad incluyen de aproximadamente 1: 1, 1,5: 1, 2: 1, 3: 1, 4: 1, 5: 1, 6: 1, 7: 1, 8: 1, 9: 1 o 10: 1, o aproximadamente 1:10, 1: 9, 1: 8, 1: 7, 1: 6, 1: 5, 1: 4, 1: 3, 1: 2, o 1: 1,5. Como ejemplo, una relación de actividad de glucagón/GLP-1 de 10: 1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1. Del mismo modo, una relación de actividad/glucagón-1 GLP de 10: 1 indica una selectividad de 10 veces para el receptor de GLP-1 en comparación con el receptor de glucagón.

[0446] En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o mayor que aproximadamente 0,1% pero menos de aproximadamente 10%, mientras que muestra al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1. Por ejemplo, los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 de ejemplo descritas en el presente documento tienen aproximadamente 0,5%, aproximadamente el 1% o aproximadamente el 7% de la actividad del glucagón natural, mientras que muestran al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

[0447] El péptido relacionado con glucagón 3 clase puede ser un péptido de glucagón con actividad aumentada o disminuida en el receptor de glucagón, o receptor de GLP-1, o ambos. El péptido relacionado con glucagón 3 clase puede ser un péptido de glucagón con selectividad alterada para el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1.

[0448] Por lo tanto, como se describe en el presente documento de alta potencia Clase se proporcionan 3 péptidos relacionados con glucagón que presentan también una mejor solubilidad y/o estabilidad. Un péptido relacionado con glucagón de clase 3 de alta potencia de ejemplo muestra al menos aproximadamente 200% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón, y opcionalmente es soluble a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8, o entre 6 y 9, o entre 7 y 9 (por ejemplo, pH 7), y retiene opcionalmente al menos 95% del péptido original (por ejemplo 5% o menos del péptido original es degradado o escindido) después de 24 horas a 25°C. Como

otro ejemplo, una realización de ejemplo de péptido relacionado con glucagón de clase 3 muestra mayor que aproximadamente 40% o mayor que aproximadamente 60% de actividad, tanto en el glucagón y los receptores de GLP-1 (en una relación entre aproximadamente 1: 3 y 3: 1, o entre aproximadamente 1: 2 y 2: 1), es opcionalmente soluble a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8 o entre 6 y 9, o entre 7 y 9 (por ejemplo, pH 7), y opcionalmente conserva al menos el 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Otro péptido relacionado con glucagón de clase 3 de ejemplo muestra aproximadamente 175% o más de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón y aproximadamente el 20% o menos de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, es opcionalmente soluble a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8 o entre 6 y 9, o entre 7 y 9 (por ejemplo, pH 7), y retiene opcionalmente al menos 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Otra péptido relacionado con glucagón de clase 3 de ejemplo muestra aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón y al menos aproximadamente 20% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, es opcionalmente soluble a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8 o entre 6 y 9, o entre 7 y 9 (por ejemplo, pH 7), y retiene opcionalmente al menos 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. Sin embargo, otro ejemplo de péptido relacionado con glucagón de clase 3 muestra aproximadamente 10% o menos, pero por encima de 0,1%, 0,5% o 1% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón y al menos aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% o más de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, es opcionalmente soluble a una concentración de al menos 1 mg/ml a un pH entre 6 y 8 o entre 6 y 9, o entre 7 y 9 (por ejemplo, pH 7), y opcionalmente retiene al menos 95% del péptido original después de 24 horas a 25°C. En algunas realizaciones, dicha Clase 3 péptidos relacionados con glucagón retienen al menos 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 de los aminoácidos de origen natural en las posiciones correspondientes en el glucagón natural (por ejemplo, tener 1-7, 1-5 o 1-3 modificaciones con respecto al origen natural glucagón).

Modificaciones que afectan a la actividad de glucagón

[0449] El aumento de actividad en el receptor de glucagón es proporcionado por una modificación de aminoácidos en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 es un agonista de glucagón que ha sido modificado con respecto al péptido de tipo natural de Su-Ser-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Met-Leu-Asn-Thr (SEQ ID NO: 1) para mejorar la potencia del péptido en el receptor de glucagón. La serina que normalmente ocurre en la posición 16 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1) puede ser sustituido con ciertos aminoácidos ácidos para mejorar la potencia de glucagón, en términos de su capacidad para estimular la síntesis de AMPc en un validado en el ensayo de modelo in vitro (ver Ejemplo 2). Más particularmente, esta sustitución mejora la potencia del análogo de al menos 2 veces, 4 veces, 5 veces, y hasta 10 veces mayor en el receptor de glucagón. Esta sustitución también mejora la actividad del análogo en el receptor de GLP-1 al menos 5 veces, 10 veces, o 15 veces en relación con el glucagón natural, pero la selectividad se mantiene por el receptor de glucagón sobre el receptor GLP-1.

[0450] 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 aminoácido cargado negativamente tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con una 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. Según algunas otras realizaciones, el residuo de serina en la posición 16 de glucagón natural está sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, treonina o glicina. Según algunas otras realizaciones, el residuo de serina en la posición 16 de glucagón natural está sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, y, en algunas realizaciones, el residuo de serina se sustituye con ácido glutámico.

[0451] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con potencia mejorada Clase 3 glucagón comprende un péptido de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 o un análogo agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 5. según algunas otras realizaciones, un péptido relacionado con glucagón 3 Clase tener aumentada su potencia en el receptor de glucagón en relación con el glucagón de tipo natural se proporciona en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, en el que el péptido de glucagón conserva su selectividad por el receptor de glucagón en relación a los receptores de GLP-1. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con 3 glucagón Clase haber mejorado la especificidad para el receptor de glucagón comprende el péptido de SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 o un análogo agonista de glucagón del mismo, en el que el amino terminal de carboxi ácido retiene su grupo ácido carboxílico natural. Según algunas otras realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de la 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: 10), en donde las exposiciones de péptidos de aproximadamente cinco veces potencia mejorada en el receptor de glucagón, con respecto al glucagón natural tal como se mide por el ensayo de AMPc in vitro del Ejemplo 2.

[0452] la actividad del receptor de glucagón se puede reducir, mantenida o mejorada por una modificación de

aminoácidos en la posición 3, por ejemplo, sustitución de la glutamina de origen natural en la posición 3. En algunas realizaciones, la sustitución del aminoácido en la posición 3 con un ácido, aminoácido básico, o hidrófobo (ácido glutámico, ornitina, norleucina) se ha demostrado para reducir sustancialmente o destruir la actividad del receptor de glucagón. Los análogos que están sustituidos con, por ejemplo, ácido glutámico, ornitina, o norleucina tienen aproximadamente 10% o menos de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón, por ejemplo, aproximadamente 1-10%, o aproximadamente 0,1-10%, o mayor de aproximadamente el 0,1%, pero menos de aproximadamente 10%, mientras que muestra al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1. Por ejemplo, los análogos de ejemplo descritas en el presente documento tienen aproximadamente 0,5%, aproximadamente el 1% o aproximadamente el 7% de la actividad del glucagón natural, mientras que muestran al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1. En particular, cualquiera de los 3 péptidos relacionados con glucagón clase, incluyendo análogos de glucagón, análogos agonistas de glucagón, glucagón co-agonistas, y glucagón/GLP-1 moléculas co-agonista, descritas aquí pueden ser modificado para contener una modificación en la posición 3, por ejemplo, Gln sustituido con Glu, para producir un péptido con una alta selectividad, por ejemplo, la selectividad diez veces, para el receptor de GLP-1 en comparación con la selectividad por el receptor de glucagón.

[0453] En otra realización, la glutamina de origen natural en la posición 3 de cualquiera de los péptidos similares al glucagón de Clase 3 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 glucagón la actividad del receptor, como se describe en el presente documento. En realizaciones específicas, el aminoácido en 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.

[0454] 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 puede ser restaurada por la estabilización de la hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón, por ejemplo, a través de 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 otras 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 sea un puente de lactama. Por ejemplo, procedimientos de unión covalente adecuadas incluyen uno cualquiera o más de metátesis de olefinas, ciclación a base de lantionina, puente de disulfuro o la formación de puentes que contiene azufre modificado, el uso de alfa, correas -diaminoalkane omega, la formación de puentes de metal-átomo, y otros medios de ciclación de péptidos.

Modificaciones que afectan a la actividad de GLP-1

[0455] 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 Clase 3 péptidos relacionados con glucagón comprenden una secuencia de SEQ ID NO: 20, en donde el aminoácido carboxi terminal tiene un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico se encuentra en el aminoácido natural. Estos 3 péptidos relacionados con glucagón clase tienen una fuerte actividad tanto en el glucagón y 1-GLP receptores y por lo tanto actúan como co-agonistas en ambos receptores. Según algunas realizaciones, el péptido relacionado con la Clase 3 el glucagón es una de glucagón y GLP-1 receptor co-agonista, en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20, en el que el aminoácido en la posición 28 es Asn o Lys y la aminoácido en la posición 29 es Thr-amida.

[0456] El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se proporciona por modificaciones que estabilizan la hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (por ejemplo, aproximadamente los residuos 12-29).

[0457] En algunas realizaciones, tales modificaciones permiten la formación de un puente intramolecular entre las cadenas laterales de los dos aminoácidos que están separadas por tres aminoácidos intermedios (es decir, un aminoácido en la posición "i" y un aminoácido en la posición "i + 4", en el que i es cualquier número entero entre 12 y 25), por dos intervenir aminoácidos, es decir, un aminoácido en la posición "j" y un aminoácido en la posición "j + 3", en la que j es cualquier número entero entre 12 y 27, o por seis intervenir aminoácidos, es decir, un aminoácido en la posición "k" y un aminoácido en la posición "k + 7", en la que k es cualquier número entero entre 12 y 22. en realizaciones de ejemplo, el puente o enlazador es de aproximadamente 8 (o cerca de 7-9) átomos de longitud y formas entre las cadenas laterales de los 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. Los dos cadenas laterales de aminoácidos se pueden unir entre sí a través de enlaces no covalentes, por ejemplo, enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, tales como la formación de la sal puentes, o por enlaces covalentes.

[0458] Según algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 muestra/actividad co-agonista de receptor de glucagón GLP-1 y comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, 47, 48 y 49. En algunas realizaciones, las cadenas laterales se unen covalentemente entre sí, y en algunas realizaciones los dos aminoácidos están unidos entre sí para formar un anillo de lactama.

[0459] Según algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende la SEQ ID NO: 45, en donde al menos un anillo de lactama está formada entre las cadenas laterales de un par de aminoácidos seleccionados del grupo que consisten en pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24 o 24 y 28. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende un análogo de péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 20, en el que 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 la clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 20, en el que un puente de lactama intramolecular se forma 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 el que la secuencia de SEQ ID NO: 29 está unido a la amino ácido C-terminal de la SEQ ID NO: 20. en otra realización, el aminoácido en la posición 28 es ácido aspártico.

[0460] En algunas realizaciones específicas, la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido relacionadas con glucagón de la clase 3 se consigue a través de la formación de un puente intramolecular que no sea un puente de lactama. Por ejemplo, procedimientos de unión covalente adecuadas incluyen uno cualquiera o más de metátesis de olefinas, ciclación a base de lantionina, puente de disulfuro o la formación de puentes que contiene azufre modificado, el uso de alfa, correas -diaminoalkane omega, la formación de puentes de metal-átomo, y otros medios de ciclación de péptidos se utilizan para estabilizar la hélice alfa.

[0461] Por otra parte, una mayor actividad en el receptor de GLP-1 se puede conseguir mediante la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de glucagón (aproximadamente los aminoácidos 12-29) mediante la introducción intencionada de una o más alfa, alfa aminoácidos disustituida en las posiciones que retienen la actividad deseada. Tales péptidos pueden ser considerados 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 de sal o 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 de glucagón está sustituido con un alfa, alfa disustituida aminoácido. Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 de la péptido relacionado con glucagón de clase 3 con ácido amino iso-butiérico (Aib) aumenta 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 sustituidos con Aib.

[0462] La actividad mejorada en el receptor de GLP-1 se puede conseguir mediante una modificación de aminoácidos 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 de enlace de hidrógeno, y es al menos aproximadamente 5 átomos (o aproximadamente 4-6) de longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina o la ornitina.

[0463] El aumento de actividad en el receptor de GLP-1 se demuestra en péptidos relacionados Clase 3 glucagón que comprenden la extensión C-terminal de la SEQ ID NO: 26. GLP-1 actividad en dicha Clase 3 péptidos relacionados con glucagón que comprenden SEQ ID NO: 26 puede ser aumentado aún más mediante la modificación del aminoácido en la posición 18, 28 o 29, o en la posición 18 y 29, como se describe en el presente documento.

[0464] A más modesto aumento de GLP-1 potencia se puede conseguir mediante la modificación del aminoácido en la posición 10 para ser Trp.

[0465] Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 puede proporcionar mayor actividad de GLP-1 que cualquiera de tales modificaciones tomados solos. Por ejemplo, los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 pueden comprender modificaciones en la posición 16, en la posición 20, y en el grupo de 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 de 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 de ácido carboxílico C-terminal; opcionalmente con la condición de que el aminoácido en la posición 12 no es Arg; u opcionalmente con la condición de que el aminoácido en la posición 9 no es Glu.

Modificaciones que afectan a la solubilidad

Adición de restos hidrófilos

[0466] 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 natural. Los restos hidrófilos como se discute aquí se pueden unir a la clase de péptido relacionado con 3 glucagón como se analiza adicionalmente en el presente documento.

[0467] Según algunas realizaciones, la introducción de grupos hidrófilos en las posiciones 17, 21 y 24 del péptido relacionado con glucagón de clase 3 comprende la SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 se prevé que mejora la solubilidad y estabilidad de análogo de glucagón de alta potencia en soluciones que tienen un pH fisiológico. La introducción de tales grupos también aumenta la duración de acción, por ejemplo, como se mide por una semivida prolongada en la circulación.

[0468] En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, en el que la cadena lateral de un residuo de aminoácido en una de la posición 16, 17, 21 o 24 de dicha Clase 3 péptido relacionado con glucagón comprende además una cadena de polietilenglicol, que tiene un peso molecular seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 40.000 Daltons. En algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5000 Daltons. En otra forma de realización, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Daltons. En aún otras realizaciones de ejemplo de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 a aproximadamente 40.000 Daltons.

[0469] restos hidrófilos adecuados incluyen cualquier polímeros solubles en agua conocidos en la técnica, incluyendo los restos hidrófilos descritos en el presente documento, homo- o co-polímeros de PEG, y un polímero monometil-sustituido de PEG (mPEG). Según algunas realizaciones, el grupo hidrófilo comprende una cadena de polietileno (PEG). Más particularmente, en algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 7 en el que una cadena de PEG está unido covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos presentes en las posiciones 21 y 24 de la péptido relacionado con glucagón de clase 3 y el aminoácido carboxi terminal del péptido relacionado con glucagón de la clase 3 tiene el grupo ácido carboxílico. Según algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Daltons.

[0470] Según algunas realizaciones, el pegilado péptido relacionado con glucagón de clase 3 comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unidos covalentemente al péptido de Clase 3 glucagón relacionado en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones el antagonista del glucagón pegilado comprende un péptido que consiste en SEQ ID NO: 5 o un análogo agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 5, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo aminoácido en la posición 21 y en la posición 24, y en donde el peso molecular combinado de los dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.

Extremo C-terminal cargado

[0471] La solubilidad del péptido relacionado con glucagón de la clase 3 que comprende la SEQ ID NO: 20 se puede mejorar más, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más Charged ácido (s) amino a la parte C-terminal del péptido de glucagón de SEQ ID NO: 20, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. Tal un aminoácido cargado puede ser introducido mediante la sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido cargado, por ejemplo, en las posiciones 28 ó 29, o alternativamente mediante la adición de una cargado de aminoácidos, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En realizaciones de ejemplo, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargadas negativamente. Las modificaciones adicionales, por ejemplo, sustituciones conservativas, se pueden hacer a la péptido relacionado con glucagón de clase 3 con el que aún permita que se retenga la actividad de glucagón. En algunas realizaciones, un análogo de la Péptido relacionado con glucagón de clase 3 de SEQ ID NO: 20 se proporciona en donde el análogo difiere de SEQ ID NO: 20 por 1 a 2 sustituciones de aminoácidos en las posiciones 17-26, y, en algunas realizaciones, el análogo difiere del péptido de SEQ ID NO: 20 por una sustitución de aminoácido en la posición 20.

Acilación/alquilación

[0472] Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo o alquilo, por ejemplo, un grupo acilo o alquilo C₄ a C₃₀. En algunos aspectos, el grupo acilo o un grupo alquilo no es de origen natural en un aminoácido. En aspectos específicos, el grupo acilo o alquilo es no natural a cualquier aminoácido de origen natural. La acilación o alquilación pueden aumentar la semivida en circulación y/o retrasar la aparición de y/o extender la duración de la acción y/o mejorar la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV. La actividad en el receptor de glucagón y receptor de GLP-1 de los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 se mantiene, si no mejora, sustancialmente después de la acilación Además, la potencia de los análogos acilados eran comparables a las versiones no acilada de los péptidos relacionados con glucagón de clase 3, si no mejora sustancialmente.

[0473] 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 de glucagón. El péptido de glucagón puede comprender adicionalmente un espaciador entre el aminoácido en la posición 10 del péptido relacionados con glucagón Clase 3 y el grupo grupo acilo o alquilo. Cualquiera de la clase anterior 3 de glucagón péptidos relacionados puede comprender dos grupos de acilo

o dos grupos alquilo, o una combinación de los mismos.

[0474] En un aspecto específico de la divulgación, el péptido relacionado con acilado Clase 3 glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 534-544 y 546-549.

5

Truncamiento C-terminal

[0475] En algunas realizaciones, los 3 péptidos relacionados con glucagón clase descrita en el presente documento se modifican adicionalmente por truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos de la C-terminal del péptido de glucagón (es decir, la posición 29 y/o 28) sin afectar la actividad y/o la potencia en el glucagón y los receptores de GLP-1. En este sentido, el péptido relacionado con glucagón 3 clase puede comprender aminoácidos 1-27 o 1-28 del péptido glucagón natural (SEQ ID NO: 1), opcionalmente con uno o más modificaciones descritas en el presente documento.

[0476] En algunas realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 truncada comprende la SEQ ID NO: 550 o la SEQ ID NO: 551. En otra realización, el péptido agonista de glucagón truncada comprende la SEQ ID NO: 552 o la SEQ ID NO: 553.

Extensión C-terminal

[0477] Según algunas otras realizaciones, los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 descritos en el presente documento están modificados por la adición de un segundo péptido al extremo carboxi del péptido de glucagón, por ejemplo, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 28. En algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de la clase 3 tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68 y SEQ ID NO: 69 está unido covalentemente a través de un enlace peptídico a un segundo péptido, en donde el segundo péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. En una realización adicional, en 3 péptidos relacionados con glucagón Clase que comprenden la extensión C-terminal, la treonina en la posición 29 del péptido de glucagón natural se reemplaza por una glicina. Un péptido relacionado con glucagón de la clase 3 que tiene una sustitución de glicina por treonina en la posición 29 y que comprende la extensión carboxi terminal de la SEQ ID NO: 26 es cuatro veces más potente en el receptor de GLP-1 como el glucagón natural modificado para comprender la extensión carboxi terminal de la SEQ ID NO: 26. la potencia en el receptor de GLP-1 se puede mejorar aún más por una sustitución de alanina por la arginina natural en la posición 18.

[0478] En consecuencia, el péptido relacionado con glucagón 3 clase puede tener una extensión carboxi terminal de la SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 28. Según algunas otras realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 3 que comprende la SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 20, comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 28 ligado a ácido 29 del péptido de glucagón amino. Más particularmente, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 27 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 28 ligado a ácido 29 del péptido de glucagón amino. Más particularmente, el péptido de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 56 que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 29 ligado a ácido 29 del péptido relacionado con glucagón 3 Clase amino. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 64.

Otras modificaciones

[0479] Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente con respecto a 3 péptidos relacionados con glucagón Clase que aumentan o disminuyen la actividad del receptor de glucagón y que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 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 tomados solos. Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente también se pueden combinar con otras modificaciones descritas en el presente documento en referencia a péptidos relacionados con glucagón de la Clase 3 que confieren otras propiedades deseables, tales como mayor solubilidad y/o estabilidad y/o duración de la acción. Alternativamente, cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente se puede combinar con otras modificaciones descritas en el presente documento en referencia a 3 péptidos relacionados con glucagón de clase que no afectan sustancialmente la solubilidad o estabilidad o actividad. Modificaciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a:

(A) mejorar la solubilidad, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más Charged ácido (s) amino a la parte C-terminal de glucagón natural, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. Tal un aminoácido cargado se puede introducir mediante la sustitución de un aminoácido natural por un aminoácido

cargado, por ejemplo, en las posiciones 28 ó 29, o alternativamente mediante la adición de un aminoácido cargado, por ejemplo, después de la posición 27, 28 o 29. En ejemplos de realización, uno, dos, tres o todos de los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otras realizaciones, uno, dos, tres o todos de los aminoácidos cargados están cargados positivamente. Tales modificaciones aumentan la solubilidad, por ejemplo, proporcionar al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o mayor solubilidad relativa al glucagón natural a un pH dado entre aproximadamente 5,5 y 8, por ejemplo, , pH 7, cuando se mide después de 24 horas a 25°C.

(B) El aumento de la solubilidad y la duración de la acción o la semivida en circulación mediante la adición de un resto hidrófilo tal 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 el amino ácido C-terminal del péptido.

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

(D) El aumento de la estabilidad por modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, por sustitución con leucina o norleucina. Tales modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa. La estabilidad también se puede aumentar mediante modificación de la Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, por 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 puede aumentarse mediante la modificación de Asp en la posición 21, por ejemplo, por sustitución con Glu. Tales modificaciones pueden reducir la degradación que se produce a través de la deshidratación de Asp para formar una succinimida intermedio cíclico seguido por isomerización a iso-aspartato.

(E) El aumento de la resistencia a la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV) la escisión por la modificación del aminoácido en la posición 1 ó 2 con la DPP-IV aminoácidos resistente descritos en el presente documento y que incluye la modificación del aminoácido en la posición 2 con N-metil- alanina.

(F) sustituciones conservativa o no conservativa, adiciones o delecciones que no afectan a la actividad, por ejemplo, las sustituciones conservativas en uno 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 de aminoácido 29 combinado opcionalmente con una amida C-terminal o éster en lugar del grupo de ácido carboxílico C-terminal;

(G) Adición de extensiones C-terminal como se describe en el presente documento;

(H) El aumento de 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 acilación o alquilación del péptido de glucagón, como se describe en el presente documento;

(I) homodimerización o heterodimerización como se describe en el presente documento.

[0480] Otras modificaciones incluyen la sustitución de His en la posición 1 con un ácido grande, aromático amino (por ejemplo, Tyr, Phe, Trp o amino-Phe); Ser en la posición 2 con Ala; sustitución de Tyr en la posición 10 con Val o Phe; sustitución de Lys en la posición 12 con Arg; sustitución de Asp en la posición 15 con Glu; sustitución de Ser en la posición 16 con Thr o Aib.

[0481] Los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 con actividad de GLP-1 que contienen una sustitución no conservativa de His en la posición 1 con un ácido grande, aromático amino (por ejemplo, Tyr) puede retener la actividad de GLP-1 siempre que el alfa-hélice es estabilizado a través de un puente intramolecular, por ejemplo, tal como cualquiera de los descritos en el presente documento.

Conjugados y fusiones

[0482] El péptido relacionado con glucagón de clase 3 puede estar unida, opcionalmente a través de un enlace covalente y opcionalmente a través de un enlazador, a un resto conjugado.

[0483] 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 terminal, por ejemplo, el extremo carboxi terminal del péptido relacionado con glucagón de clase 3.

[0484] Más particularmente, el péptido relacionado con glucagón de Clase 3 de fusión puede comprender un agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 28 (KRNRR) unido a ácido 29 del péptido de glucagón amino. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 26 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 27 (KRNRRNNIA) o SEQ ID NO: 28 (KRNRR) está unido al aminoácido 29 del péptido relacionado con glucagón de clase 3 a través de un enlace peptídico. Los solicitantes han descubierto que en 3 péptidos de fusión péptido relacionados con glucagón Clase comprenden el péptido extensión C-terminal de exendina-4 (por ejemplo, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29), la sustitución del residuo treonina natural en la posición 29 con glicina aumenta dramáticamente la actividad del receptor de GLP-1. Esta sustitución de aminoácidos puede ser usado en conjunción con otras modificaciones descritas en el presente documento con respecto a los péptidos relacionados con glucagón de clase 3 para mejorar la afinidad de los análogos de glucagón para el receptor de GLP-1. Por ejemplo, la sustitución 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 adición de una cadena de PEG como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 64. En algunas realizaciones, la parte de péptido relacionado con glucagón clase 3 del péptido de fusión de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5 en el que una cadena de PEG, cuando está presente en las posiciones 17, 21, 24, o el aminoácido C-terminal, o en ambos 21 y 24, se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. Más particularmente, en algunas realizaciones, el segmento de péptido relacionado con 3 glucagón Clase se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 63, en el que la cadena de PEG se selecciona del rango de 500 a 5.000. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 es un péptido de fusión que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55 y SEQ ID NO: 65 en el que el péptido de SEQ ID NO: 65 está unida al extremo carboxi de la SEQ ID NO: 55.

[0485] Según algunas realizaciones, una modificación química adicional de la péptido relacionado con glucagón de clase 3 con el de la SEQ ID NO: 10 Otorga aumentó GLP-1 potencia receptor a un punto en el que la actividad relativa en el glucagón y 1-GLP receptores es prácticamente equivalente. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende un aminoácido terminal que comprende un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural. La actividad relativa del péptido relacionado con glucagón de Clase 3 en los respectivos receptores de glucagón y GLP-1 se puede ajustar por otras modificaciones al péptido relacionado con glucagón de clase 3 para producir análogos que demuestran aproximadamente 40% a aproximadamente 500% o más de la actividad de natural glucagón en el receptor de glucagón y aproximadamente 20% a aproximadamente 200% o más de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, por ejemplo, 50 veces, 100 veces o más aumento relativo a la actividad normal de glucagón en el GLP-1 receptor. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en el presente documento muestran hasta aproximadamente 100%, 1000%, 10,000%, 100 000%, o 1.000.000% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, los péptidos de glucagón descritos en el presente documento muestran hasta aproximadamente 100%, 1000%, 10,000%, 100 000%, o 1.000.000% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

Realizaciones de ejemplo

[0486] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un análogo de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55, en donde dicho análogo difiere de SEQ ID NO: 55 con 1 a 3 aminoácidos, seleccionados de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21, 24, 27, 28, y 29, en el que dicho péptido muestra glucagón al menos el 20% de la actividad de GLP-1 natural en el GLP 1 receptor.

[0487] De acuerdo con algunas realizaciones, se proporciona un co-agonista 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-Asp-Phe-Val-Xaa -Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 33) en donde 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 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 R es 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 la SEC ID N^o: 33 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: 29 o SEQ ID NO: 65 está unida covalentemente al extremo carboxi de SEQ ID NO. : 33

[0488] En algunas realizaciones se proporciona un co-agonista comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 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 de ácido carboxílico del aminoácido natural. En algunas otras realizaciones el análogo de glucagón comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44.

[0489] Según algunas realizaciones un análogo de péptido de glucagón de la SEQ ID NO: Se proporciona 33, donde dicho análogo difiere de SEQ ID NO: 33 con 1 a 3 aminoácidos, 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, ya sea la posición 20 es lisina, o se forma un puente de lactama entre el aminoácido de la posición 24 y, o bien el aminoácido en la posición 20 o la posición 28. Según algunas otras realizaciones el análogo difiere de SEQ ID NO: 33 con 1 a 3 aminoácidos seleccionada de las posiciones 1, 2, 3, 21 y 27. en algunas realizaciones el análogo de péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 33 difiere de la secuencia por 1 a 2 aminoácidos, o en algunas otras realizaciones por un único aminoácido, forma posiciones seleccionadas 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, ya sea la posición 20 es lisina, o se forma un puente de lactama entre el aminoácido una posición t 24 y, o bien el aminoácido en la posición 20 o la posición 28.

[0490] De acuerdo con otra realización, se proporciona un agonista del receptor de GLP-1 relativamente selectivo 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: 53) en donde el Xaa en la posición 3 se selecciona del grupo de amino ácidos 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 aminoácidos que consiste en de 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 R es COOH, CONH₂, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29, 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 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. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón, que incluye un péptido coagonista, comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 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.

[0491] Según algunas otras realizaciones se proporciona un glucagón/GLP-1 receptor co-agonista que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en:

[0492] 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: 34), en el que el Xaa en la posición 15 se selecciona del grupo de aminoácidos que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y homocisteico ácido, 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, R es COOH o CONH₂, el Xaa en la posición 29 es Thr o Gly, y R es COOH, CONH₂, SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29, con la condición que cuando la posición 16 es serina, la posición 20 es Lys, o alternativamente cuando la posición 16 es serina de la posición 24 es Glu y, o bien la posición 20 o la posición 28 es Lys. En algunas realizaciones R es CONH₂, el Xaa en la posición 15 es Asp, el Xaa en la posición 16 se selecciona del grupo de aminoácidos constituido por Glu, Gln, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, el XaaS 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 el XaaS en las posiciones 15 y 16 son cada Glu, la 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 R es CONH₂.

[0493] Se ha informado de que ciertas posiciones de la péptido de glucagón natural pueden ser modificados al tiempo que conserva al menos parte de la actividad del péptido precursor. Según ello, los solicitantes prevén que uno o más de los aminoácidos localizados en las posiciones en las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29 del péptido de la SEQ ID NO: 11 puede ser sustituido con un aminoácido diferente de la presente en el péptido de tipo glucagón natural, y aún conservan actividad en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones se cambia el residuo de metionina presente en la posición 27 del péptido natural de leucina o norleucina para evitar 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 sustituido con Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico.

[0494] En algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: se presentó 20 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 de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 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 de la posición 24 es Glu y, o bien la posición 20 o la posición 28 es Lys. Según otra realización, un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: se proporciona 20 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 de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En otra realización, un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 11 se proporciona en 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 de los correspondientes aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en una realización adicional, la una a dos diferentes aminoácidos representan sustituciones conservativas de aminoácidos en relación con el aminoácido presente en la secuencia de glucagón natural (SEQ ID NO: 1). En algunas realizaciones, un péptido de glucagón de la SEQ ID NO: se proporciona 15 en el que el péptido de glucagón comprende además uno, dos o tres sustituciones de aminoácidos en posiciones seleccionadas a partir de: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO las 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 conservativas de aminoácidos.

[0495] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un glucagón/GLP-1 receptor co-agonista que comprende una variante de la secuencia de la SEQ ID NO 33, en donde 1 a 10 aminoácidos seleccionados de las posiciones 16, 17, 18, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29, respectivamente, de la variante de diferir de la correspondiente de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. según algunas realizaciones se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 33 en el

que las variantes difiere de SEQ ID NO: 33 por una o más sustituciones de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Gln17, Ala18, Glu21, Ile23, Ala24, Val27 y Gly29. Según algunas otras realizaciones se proporciona un glucagón/GLP-1 receptor co-agonista que comprende variantes de la secuencia de la SEQ ID NO 33, en el que de 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-26 de la variante difiere de la correspondiente de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. según algunas realizaciones se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 33 en la que la variante difiere de la SEQ ID NO: 33 por una sustitución de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gln17, Ala18, Glu21, Ile23 y Ala24. Según algunas realizaciones se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 33 en la que la variante difiere de la SEQ ID NO: 33 por una sustitución de aminoácido en la posición 18 en el que el aminoácido sustituido se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ser, Thr, y Gly. Según algunas realizaciones se proporciona una variante de la secuencia de SEQ ID NO 33 en la que la variante difiere de la SEQ ID NO: 33 por una sustitución de aminoácidos de Ala en la posición 18. Tales variaciones están abarcadas por la SEQ ID NO: 55. En otra realización se proporciona un receptor co-agonista de glucagón/GLP-1 que comprende variantes de la secuencia de la SEQ ID NO 33, en el que de 1 a 2 aminoácidos seleccionados de las posiciones 17-22 de la variante difiere de la correspondiente de aminoácidos de SEQ ID NO : 1, y en una realización adicional se proporciona una variante de la SEQ ID NO 33 en la que la variante difiere de la SEQ ID NO: 33 por 1 o 2 sustituciones de aminoácidos en las posiciones 20 y 21. de conformidad con algunas realizaciones, una de glucagón/GLP se proporciona 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-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Met-Xaa-Xaa-R (SEQ ID NO: 51), en el que el Xaa en la posición 15 es Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico o homo ácido cisteico, el Xaa en la posición 16 es Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, el Xaa en la posición 20 es Gln, Lys, Arg, Orn o citrulina, el Xaa en la posición 21 es Asp, Glu, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, el Xaa en la posición 24 es Gln o Glu, la 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 R es COOH o CONH₂. En algunas realizaciones R es CONH₂. Según algunas otras realizaciones se proporciona un receptor co-agonista de glucagón/GLP-1 que comprende una variante de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48 o SEQ ID NO: 49, en el que la variante difiere de dicha secuencia por una sustitución de aminoácido 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.

[0496] En algunas realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 34 en el que el análogo difiere de SEQ ID NO: 34 por tener un aminoácido distinto de serina en la posición 2. En algunas realizaciones, el residuo de serina es sustituido con aminoácidoisobutírico, D-alanina, y en algunas realizaciones, el residuo de serina se sustituye con aminoácidoisobutírico. Tales modificaciones suprime la escisión por la dipeptidil peptidasa IV mientras que conserva la potencia inherente del compuesto de origen (por ejemplo, al menos 75, 80, 85, 90, 95% o más de la potency del compuesto original). En algunas otras realizaciones se incrementa la solubilidad del análogo de, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más aminoácidos cargados a la parte C-terminal de glucagón natural, preferiblemente en una posición C-terminal a la posición 27. En realizaciones de ejemplo, uno, dos, tres o todos de los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otra forma de realización el análogo comprende, además, un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido natural en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadió al extremo carboxi del péptido de la SEQ ID NO: 34.

[0497] En algunas realizaciones, los análogos de glucagón descritos en la presente se modifican adicionalmente en la posición 1 o 2 para reducir la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. En algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: se proporciona 15 donde el análogo difiere de la: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO molécula original por una sustitución en la posición 2 y muestra susceptibilidad reducida (es decir, resistencia) a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones la posición 2 del péptido análogo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, amino n-butírico, glicina, serina N-metilo y aminoácidoisobutírico. En algunas otras realizaciones la posición 2 del péptido análogo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, glicina, serina N-metilo y aminoácidoisobutírico. En otra posición de la realización 2 del péptido análogo está sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, glicina, serina N-metilo y aminoácidoisobutírico. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 2 no es D-serina. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 21 o SEQ ID NO: 22.

[0498] En algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: se proporciona 15 en el que el análogo difiere de la molécula de origen por una sustitución en la posición 1 y muestra susceptibilidad reducida (es decir, resistencia) a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, la posición 1 del péptido análogo se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), histidina N-metilo, histidina alfa-metilo, ácido acético imidazol, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homohistidina. En otra realización se proporciona un agonista de glucagón que comprende un péptido análogo de la SEQ ID NO: 34 en el que el análogo difiere de SEQ ID NO: 34 por tener un aminoácido distinto de histidina en la posición 1. En algunas otras realizaciones se incrementa la solubilidad del análogo de, por ejemplo, mediante la introducción de uno, dos, tres o más aminoácidos cargados a la parte C-terminal de glucagón natural, preferiblemente en una

posición C-terminal a la posición 27. En realizaciones de ejemplo, uno, dos, tres o todos los aminoácidos cargados están cargados negativamente. En otra forma de realización el análogo comprende, además, un aminoácido ácido sustituido por el aminoácido natural en la posición 28 o 29 o un aminoácido ácido añadido al extremo carboxi del péptido de la SEQ ID NO: 34. En algunas realizaciones, el aminoácido ácido es ácido aspártico o ácido glutámico.

[0499] En algunas realizaciones, el coagonista del receptor de glucagón/GLP-1 comprende una secuencia de SEQ ID NO: 20 que comprende además una extensión carboxi terminal adicional de un aminoácido o un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. En la realización en la que un único aminoácido se añade al extremo carboxi terminal de la SEQ ID NO: 20, el aminoácido se selecciona típicamente de uno de los 20 aminoácidos comunes, y en algunas realizaciones el carboxi aminoácido terminal adicional tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido natural. En algunas realizaciones, el aminoácido adicional se selecciona del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido aspártico y glicina.

[0500] En una realización alternativa, se proporciona un coagonistas del receptor de glucagón/GLP-1 en el que el péptido comprende 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 residuo de lisina están separadas por tres aminoácidos. En algunas realizaciones, el aminoácido carboxi terminal del péptido de glucagón cojinete lactama tiene un grupo amida en lugar del ácido carboxílico del aminoácido natural. Más particularmente, en algunas realizaciones se proporciona un glucagón y GLP-1 co-agonista que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en:

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: 66)

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: 67)

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: 68)

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: 69)

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: 16)

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: 17)

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: 18)

en la que Xaa en la posición 28 es Asp, o Asn, el Xaa en la posición 29 es Thr o Gly, R se selecciona del grupo que consiste en COOH, CONH₂, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, y un puente de lactama está formado entre Lys en la posición 12 y Glu en la posición 16 para la SEQ ID NO: 66, entre Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 para la SEQ ID NO: 67, entre Lys en la posición 20 y Glu en la

posición 24 para la SEQ ID NO: 68, entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para la SEQ ID NO: 69, 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 la SEQ ID NO: 16, 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 la SEQ ID NO: 17 y entre Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20 y entre Glu en la posición 24 y Lys en la posición 28 para la SEQ ID NO: 18. En algunas realizaciones R se selecciona del grupo que consiste en de COOH, CONH 2, ácido glutámico, ácido aspártico, glicina, el aminoácido en la posición 28 es Asn, y el aminoácido en la posición 29 es treonina. En algunas realizaciones R es CONH 2, el aminoácido en la posición 28 es Asn y el aminoácido en la posición 29 es treonina. En otra realización R se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 65 y el aminoácido en la posición 29 es glicina.

[0501] En una realización adicional, el glucagón/GLP-1 receptor co-agonista se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18, en el que el péptido comprende además una extensión carboxi terminal adicional de un aminoácido o un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. En algunas otras realizaciones la extensión terminal comprende la secuencia de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 65 y el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55. En algunas realizaciones, el glucagón/GLP-1 receptor co-agonista comprende la secuencia de SEQ ID NO: 33 en el que el aminoácido en la posición 16 es ácido glutámico, el aminoácido en la posición 20 es lisina, el aminoácido en la posición 28 es asparagina y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No: 26 o SEQ ID NO: 29 está unida al extremo carboxi-terminal de la SEQ ID NO: 33.

[0502] En la realización en la que un único aminoácido se añade al extremo carboxi terminal de la SEQ ID NO: 20, 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 natural. 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.

[0503] En otra realización, el glucagón/GLP-1 receptor co-agonista comprende la secuencia: NH 2-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-Xaa-CONH2 (SEQ ID NO: 19), en el que el Xaa en la posición 30 representa cualquier aminoácido. En algunas 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 puede mejorarse aún más mediante la unión covalente de una cadena de PEG a la cadena lateral de aminoácido en la posición 17, 21, 24 o 30 de la SEQ ID NO: 19. En una realización adicional, el péptido comprende una extensión carboxi terminal adicional de un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28. según algunas realizaciones, el glucagón/GLP-1 receptor co-agonista comprende la secuencia de SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31 y SEQ ID NO: 32.

[0504] El sitio adicional modificaciones específicas internos a la secuencia de glucagón de la SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 64 se pueden hacer para producir un conjunto de agonistas de glucagón que poseen grados variables de GLP-1 agonismo. En consecuencia, los péptidos que poseen prácticamente idéntica potencia in vitro en cada receptor se han preparado y caracterizado. Del mismo modo, los péptidos con una potencia de diez veces mayor selectivamente en cada uno de los dos receptores se han identificado y caracterizado. Como se señaló anteriormente sustitución del residuo de serina en la posición 16 con ácido glutámico aumenta la potencia de glucagón natural, receptores de glucagón y GLP-1, pero mantiene aproximadamente una selectividad diez veces para el receptor de glucagón. Además mediante la sustitución de la glutamina natural en la posición 3 con ácido glutámico (SEQ ID NO: 22) genera un análogo de glucagón que presenta aproximadamente una selectividad diez veces para el receptor de GLP-1.

[0505] La solubilidad de los péptidos co-agonista glucagón/GLP-1 se puede mejorar más en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras que conserva la actividad biológica alta en relación con el glucagón natural por 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 co-agonista de glucagón/GLP-1. Según algunas realizaciones, el grupo hidrófilo comprende una cadena de polietileno (PEG). Más particularmente, en algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18 en el que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un amino ácidos 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 la SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 de la cadena de polietilenglicol se une covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 17, 21 o 24, cuando el péptido comprende la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 15 de la cadena de polietilenglicol se une covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 16, 17 o 21, y cuando el péptido comprende la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18 de la cadena de polietilenglicol se une covalentemente a un residuo de

aminoácido en la posición 17 o 21.

[0506] En algunas realizaciones, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, 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 de glucagón, y el aminoácido carboxi terminal del péptido tiene un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico del aminoácido natural. En algunas realizaciones el receptor co-agonista de péptido de glucagón/GLP-1 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17, 21 o 24 de la SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 y SEQ ID NO: 19, o en la posición 16, 17 o 21 de la SEQ ID NO: 14 y SEQ ID NO: 15 o en la posición 17 o 21 de la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18 del péptido de glucagón. En otra realización, el co-agonista de péptido de glucagón/GLP-1 receptor comprende la secuencia de SEQ ID NO: 11 o SEQ ID NO: 19, en el 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 de glucagón.

[0507] Según algunas otras realizaciones, y con sujeción a las limitaciones de salvedad descritos en los párrafos anteriores, el péptido de glucagón co-agonista se modifica para contener uno o más sustitución de aminoácidos en las posiciones 16, 17, 21, 24, o 29 o el aminoácido C-terminal, en donde el aminoácido natural está sustituido con un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo por ejemplo, PEG. El péptido natural puede estar sustituido con un aminoácido de origen natural o sintético (de origen no natural) de aminoácidos. Sintético o de origen no natural aminoácidos se refieren a aminoácidos que no ocurren de forma natural *in vivo* pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas aquí. Alternativamente, el aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo por ejemplo, PEG, se puede añadir al extremo carboxi de cualquiera de los análogos de glucagón descritos en el presente documento. Según algunas otras realizaciones una sustitución de aminoácidos se hace en el péptido co-agonista de glucagón/GLP-1 receptor en una posición seleccionada del grupo que consiste en 16, 17, 21, 24, o 29 sustituyendo el aminoácido natural por un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en lisina, cisteína, la ornitina, la homocisteína y la fenilalanina acetilo, en donde el aminoácido sustituyente comprende además una cadena de PEG unida covalentemente a la cadena lateral del aminoácido. En algunas realizaciones, un péptido de glucagón selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 y SEQ ID NO: 19 se modifica además para comprender una cadena de PEG está unido covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 17 o 21 del péptido de glucagón. En algunas realizaciones el pegilado glucagón/GLP-1 receptor co-agonista comprende además la secuencia de SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27 o SEQ ID NO: 29.

[0508] En otra realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56, que comprende además una extensión C-terminal de la SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 29 o SEQ ID NO: 65 unido al aminoácido C-terminal de la SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56, y que comprende opcionalmente además una 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 de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55 o SEQ ID NO: 56, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral de un aminoácido en la posición 21 o 24 del péptido de glucagón y el péptido más comprende una extensión C-terminal de la SEQ ID NO: 26, o SEQ ID NO: 29.

[0509] En otra realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 55, o SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34, en el que un aminoácido adicional se añade al extremo carboxi de la SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34, 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 la SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 unido al aminoácido C-terminal de la SEQ ID NO: 33 o SEQ ID NO: 34. En otra realización, el péptido de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 30 del péptido de glucagón y el péptido comprende además una extensión C-terminal de la SEQ ID NO: 26 o SEQ ID NO: 29 unido al aminoácido C-terminal de la SEQ ID NO: 19.

[0510] La cadena de polietilenglicol puede estar en la forma de una cadena lineal o puede ser ramificado. Según algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Daltons. En algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización alternativa de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 10.000 a aproximadamente 20.000 Daltons. Según algunas realizaciones, el péptido de glucagón pegilado comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unido covalentemente al péptido de tipo glucagón en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones el antagonista del glucagón pegilado comprende un péptido que consiste en SEQ ID NO: 5 o un análogo agonista de glucagón de la SEQ ID NO: 5, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente al residuo aminoácido en la posición 21

y en la posición 24, y en donde el peso molecular combinado de los dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.

5 **[0511]** En ciertas realizaciones de ejemplo, el péptido de glucagón comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con hasta diez modificaciones de aminoácidos 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 C₄ de ácido graso C₃₀. En ciertos aspectos, el aminoácido en la posición 10 comprende un grupo acilo o un grupo alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural.

10 **[0512]** En ciertas realizaciones, el péptido de glucagón que comprende un aminoácido en la posición 10, que es acilado o alquilado comprende una hélice alfa estabilizado. Por consiguiente, en ciertos aspectos, el péptido de glucagón comprende un grupo acilo o alquilo tal como se describe en el presente 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, en el que i es 12, 16, 20, o 24. Alternativamente o adicionalmente, el péptido de glucagón comprenden un grupo acilo o alquilo como se ha descrito en el presente documento y uno, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 y/o 24 del péptido de glucagón están sustituidos con un aminoácido alfa, alfa disustituido, por ejemplo, Aib. En algunos casos, el péptido de glucagón no natural comprende Glu en la posición 16 y Lys en la posición 20, en el que, opcionalmente, un puente de lactama Inkes 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.

20 **[0513]** Además, en cualquiera de las realizaciones, en el que el péptido de glucagón comprende un aminoácido en la posición 10 que está acilado o alquilado, el péptido de glucagón puede comprender, además, una amida C-terminal en lugar del carboxilato alfa C-terminal.

25 **[0514]** En algunas realizaciones, el péptido de glucagón que comprende un grupo acilo o alquilo tal como se describe en el presente documento comprende además una sustitución de aminoácido en la posición 1, en la posición 2, o en las posiciones 1 y 2, en el que la sustitución (s) de aminoácidos lograr DPP resistencia a la proteasa -IV. Por ejemplo, el en la posición 1 Su puede estar sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), histidina N-metilo, histidina alfa-metil, acético imidazol ácido, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Alternativa o adicionalmente, la Ser en la posición 2 puede estar sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: D-serina, alanina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, N-metil alanina, y ácido aminoisobutírico ácido. En algunas realizaciones, el aminoácido en la posición 2 no es D-serina.

30 **[0515]** El péptido de glucagón que comprende el aminoácido en la posición 10, que es acilado o alquilado tal como se describe en el presente documento puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos que es sustancialmente relacionado con SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el péptido de glucagón comprende la SEQ ID NO: 1 con hasta 10 modificaciones de aminoácidos (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 modificaciones). En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del péptido de glucagón acilado o alquilado es mayor que 25% idéntica a SEQ ID NO: 1 (por ejemplo, mayor que 30%, 35%, 40%, 50%, 60%, 70% 75 %, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o casi el 100% idéntica a SEQ ID NO: 1). En ciertas realizaciones específicas, el péptido de glucagón es uno que comprende SEQ ID NOs: 55 con un aminoácido en la posición 10 acilado o alquilado tal como se describe en el presente documento. El péptido de glucagón puede ser cualquiera de SEQ ID NOs: 55, 55 con 1 ó 2 modificaciones de aminoácidos, 2-4, 9-18, 20, 23-25, 33, 40-44, 53, 56, 61, 62, 64, 66 a 514, y 534.

40 **[0516]** El grupo acilo o alquilo de estas otras realizaciones puede ser cualquier grupo acilo o alquilo descritos en el presente documento. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser un C₄ a C₃₀ (por ejemplo, C₈ a C₂₄) grupo acilo graso y el grupo alquilo puede ser un C₄ a C₃₀ (por ejemplo, C₈ a C₂₄) grupo alquilo.

50 **[0517]** El aminoácido a la que el grupo acilo o alquilo está unido puede ser cualquiera de los aminoácidos descritos en el presente documento, por ejemplo, un aminoácido de cualquiera de Fórmula I (por ejemplo, Lys), fórmula II, y la Fórmula III.

55 **[0518]** En algunas realizaciones, el grupo acilo o el grupo alquilo está unido directamente al aminoácido en la posición 10. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido al aminoácido en la posición 10 a través de un espaciador, tal como, por ejemplo, un espaciador que es de 3 a 10 átomos de longitud, por ejemplo, un aminoácido o dipéptido. Los espaciadores adecuados para los propósitos de unión de un grupo acilo o alquilo se describen en el presente documento.

60 **[0519]** Según algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón 3 clase puede ser un análogo de cualquiera de la clase anterior 3 de glucagón péptidos relacionados como se describe en el presente documento, que presenta actividad análogo agonista en el receptor de GIP. El nivel de actividad del análogo en el receptor de glucagón, el receptor de GLP-1, y el receptor de GIP, la potencia en cada uno de estos receptores, y la selectividad para cada uno de estos receptores puede estar según las enseñanzas de glucagón Clase 2 relacionada péptidos

descritos en el presente documento. Véase, las enseñanzas bajo la subsección de la sección péptido relacionado con glucagón 2 Clase titulado "actividad".

5 **[0520]** En algunas realizaciones de la descripción, un análogo de un péptido de glucagón, que presenta actividad análogo agonista en el receptor de GIP, se proporciona. El análogo en ciertas realizaciones comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 con al menos una modificación de aminoácidos (opcionalmente, hasta 15 amino modificaciones de ácido), y una extensión de 1 a 21 aminoácidos C-terminal al aminoácido en la posición 29 de la analógica.

10 **[0521]** En ciertos aspectos, los análogos comprenden al menos una modificación de aminoácidos y modificaciones de ácido de hasta 15 amino (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 modificaciones de aminoácidos, hasta 10 modificaciones de aminoácidos). En ciertas realizaciones, los análogos comprenden al menos una modificación de aminoácidos en hasta 10 modificaciones de aminoácidos y modificaciones conservativas de aminoácidos adicionales. Las modificaciones conservativas de aminoácidos se describen en el presente documento.

15 **[0522]** En algunos aspectos, al menos una de las modificaciones de aminoácidos confiere una estructura de hélice alfa estabilizado en la parte C-terminal del análogo. Las modificaciones que logran una estructura de hélice alfa estabilizada se describen en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas en la sección de Estabilización de las hélice alfa/puentes intramoleculares. En algunos aspectos, el análogo comprende un puente intramolecular (por ejemplo, un puente intramolecular covalente, un puente intramolecular no covalente) entre las cadenas laterales de dos aminoácidos de la analógica. En ciertos aspectos, un puente intramolecular une las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones i e $i + 4$, en el que i es 12, 13, 16, 17, 20, o 24. En otros aspectos, un puente intramolecular conecta las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones j y $j + 3$, en el que j es 17, o en las posiciones k y $k + 7$ en la que k es cualquier número entero entre 12 y 22. En ciertas realizaciones, el puente intramolecular es un puente intramolecular covalente, por ejemplo, un puente de lactama. En aspectos específicos, el puente de lactama conecta las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20. En aspectos particulares, uno de los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 es un aminoácido-carga positiva y el otro es un aminoácido de carga negativa. Por ejemplo, el análogo puede comprender un puente de lactama que conecta las cadenas laterales de una Glu en la posición 16 y una Lys en la posición 20. En otros aspectos, el aminoácido de carga negativa y el positivo cargado aminoácido forman un puente de sal. En este caso, el puente intramolecular es una en covalente puente intramolecular.

20 **[0523]** En aspectos particulares, la modificación de aminoácidos que confiere una hélice alfa estabilizado es una inserción o sustitución de un aminoácido de la SEQ ID NO: 1 con un aminoácido alfa, alfa disustituido. Los aminoácidos alfa, alfa disustituidos adecuados para los fines de la estabilización de la hélice alfa se describen en el presente documento e incluyen, por ejemplo, Aib. En algunos aspectos, uno, dos, tres, o más de los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21, y 24 de la SEQ ID NO: 1 están sustituidos con un alfa, alfa disustituida aminoácido, por ejemplo, Aib. En realizaciones particulares, el aminoácido en la posición 16 es Aib.

25 **[0524]** El análogo que muestra actividad agonista en el receptor GIP puede comprender modificaciones adicionales, tales como cualquiera de los descritos en el presente documento. Por ejemplo, las modificaciones de aminoácidos pueden aumentar o disminuir la actividad en uno o ambos de los receptores de glucagón y receptor de GLP-1. Las modificaciones de aminoácidos pueden aumentar la estabilidad del péptido, por ejemplo, aumentar la resistencia a DPP-IV degradación por proteasas, estabilizar el enlace entre los aminoácidos 15 y 16. Las modificaciones de aminoácidos pueden aumentar la solubilidad del péptido y/o alterar el tiempo de de acción del análogo en cualquiera de la GIP, glucagón y GLP-1 receptores. Una combinación de cualquiera de estos tipos de modificaciones pueden estar presentes en los análogos que muestran actividad agonista en el receptor GIP.

30 **[0525]** Por consiguiente, en algunos aspectos, el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 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 de aminoácidos conservativas de la misma. En algunos aspectos, el análogo comprende una amida C-terminal en lugar del carboxilato alfa C-terminal. En ciertas realizaciones, el análogo comprende una sustitución de aminoácido en la posición 1, posición 2, o las posiciones 1 y 2, que sustitución (s) lograr DPP-IV resistencia a la proteasa. Las sustituciones de aminoácidos adecuados se describen en el presente 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.

35 **[0526]** 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 está sustituido con Glu o un análogo de glutamina; (C) Thr en la posición 7 sustituido con un Ile; (D) Tyr en la posición 10 sustituido con Trp o un aminoácido que comprende un grupo acilo o alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural; (E) Lys en la posición 12 sustituido con Ile; (F) Asp en la posición 15 sustituido con Glu; (G) Ser en la posición 16 sustituido con Glu; (H) Gln en la posición 20 sustituido con Ser, Thr, Ala, Aib; (I) Gln en la posición 24 sustituido 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 (1) Thr en la posición 29 sustituido con Gly o un aminoácido cargado, opcionalmente, Asp o Glu.

5 **[0527]** Con respecto a los análogos que muestran actividad agonista en el receptor GIP, el análogo comprende una extensión de 1-21 aminoácidos (por ejemplo, 5-19, 7-15, 9-12 aminoácidos). La extensión del análogo puede comprender cualquier secuencia de aminoácidos, siempre que la extensión es 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: 26 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: 26 o 674, o (iii) la secuencia de aminoácidos de (i) o (ii) con una o más modificaciones de aminoácidos conservativas.

10 **[0528]** En algunas realizaciones, al menos uno de los aminoácidos de la extensión es acilado o alquilado. El aminoácido que comprende el grupo acilo o alquilo puede estar situado en cualquier posición de extensión de la analógica. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado de la extensión se encuentra en una de las posiciones 37, 38, 39, 40, 41, o 42 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1) de la analógica. En ciertas realizaciones, el aminoácido acilado o alquilado se encuentra en la posición 40 de la analógica.

15 **[0529]** En realizaciones de ejemplo, el grupo acilo o alquilo es un grupo acilo o alquilo que es no natural a un aminoácido de origen natural. Por ejemplo, el grupo acilo o alquilo puede ser un C₄ a C₃₀ (por ejemplo, C₁₂ a C₁₈) grupo acilo graso o C₄ a C₃₀ (por ejemplo, C₁₂ a C₁₈) alquilo. El grupo acilo o alquilo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento.

20 **[0530]** En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido directamente al aminoácido, por ejemplo, a través de la cadena lateral del aminoácido. En otras realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido al aminoácido a través de un espaciador (por ejemplo, un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, un espaciador bifuncional hidrófilo, un espaciador bifuncional hidrófobo). En ciertos aspectos, el espaciador es de 3 a 10 átomos de longitud. En algunas realizaciones, el espaciador de aminoácidos no está gamma Glu. En algunas realizaciones, el espaciador dipéptido no es gamma -Glu- gamma Glu.

25 **[0531]** Además, en ejemplos de realización, el aminoácido al que el grupo acilo o alquilo está unido puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, un aminoácido de Fórmula I, II, o III. El aminoácido que está acilado o alquilado puede ser una Lys, por ejemplo. Los ácidos adecuados aminoácidos que comprenden un grupo acilo o alquilo, así como grupos acilo adecuados y grupos alquilo, se describen en el presente documento. Véase, por ejemplo, las enseñanzas bajo las secciones tituladas acilación y alquilación.

30 **[0532]** En otras realizaciones, 1-6 aminoácidos (por ejemplo, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5 aminoácidos) de la extensión son los aminoácidos de carga positiva, por ejemplo, aminoácidos de fórmula IV, tal como, por ejemplo, Lys. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "aminoácido-carga positiva" se refiere a cualquier aminoácido, natural o de origen no natural, que comprende una carga positiva en un átomo de su cadena lateral a un pH fisiológico. En ciertos aspectos, los aminoácidos de carga positiva se encuentran en cualquiera de las posiciones 37, 38, 39, 40, 41, 42, y 43. En realizaciones específicas, un aminoácido-carga positiva se encuentra en la posición 40.

35 **[0533]** En otros casos, la extensión es acilado o alquilado tal como se describe en el presente documento y comprende 1-6 aminoácidos cargados positivos como se describe en el presente documento.

40 **[0534]** En otras realizaciones, los análogos que muestran actividad agonista en el GIP comprende los receptores de (i) SEQ ID NO: 1 con al menos una modificación de aminoácidos, (ii) una extensión de 1 a 21 aminoácidos (por ejemplo, 5 a 18, 7 a 15, 9 a 12 aminoácidos) C-terminal para el aminoácido en la posición 29 del análogo, y (iii) un aminoácido que comprende un grupo acilo o alquilo que es no natural a un origen natural 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 C₄ de acilo graso C₃₀ o C₄ a grupo alquilo C₃₀. En algunas realizaciones, el grupo acilo o alquilo está unido a través de un espaciador, por ejemplo, un aminoácido, dipéptido, tripéptido, el espaciador bifuncional hidrófilas, hidrófobas espaciador bifuncional). En ciertos aspectos, el análogo comprende una modificación de aminoácidos que estabiliza la hélice alfa, tal como un puente de sal entre una Glu en la posición 16 y una Lys en la posición 20, o un ácido alfa, amino-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 DPP-IV resistencia a la proteasa, por ejemplo, DMIA en la posición 1, Aib en la posición 2. los análogos que comprende además amino modificaciones de ácido se contemplan en el presente documento.

45 **[0535]** En ciertas realizaciones, los análogos que tienen GIP actividad del receptor muestran al menos 0,1% (por ejemplo, al menos 0,5%, 1%, 2%, 5%, 10%, 15%, o 20%) la actividad de GIP natural en el receptor de GIP. En algunas realizaciones, los análogos muestran más de 20% (por ejemplo, más de 50%, más del 75%, más de 100%, más de 200%, más de 300%, más de 500%) la actividad de GIP natural en el receptor GIP. En algunas realizaciones, el análogo muestra actividad agonista apreciable en uno o ambos de los receptores de GLP-1 y el glucagón. En algunos aspectos, la selectividad para estos receptores (receptores de GIP y del receptor de GLP-1 y/o del receptor de glucagón) están dentro de 1.000 veces. Por ejemplo, la selectividad para el receptor de GLP-1 de los

análogos que tienen actividad de receptor de GIP puede ser inferior a 500 veces, 100 veces, dentro de 50 veces, dentro de 25 veces, dentro de 15 veces, dentro de 10 veces) la selectividad para el receptor de GIP y/o el receptor de glucagón.

5 **[0536]** Según algunas otras realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 3 comprende la secuencia de aminoácidos del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) 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; en el que Lys en la posición 10 se acila con un C₁₄ o de ácidos grasos C₁₆, y en el que el carboxilato C-terminal se reemplaza con una amida. En una realización específica, este péptido relacionado con glucagón de clase 3 está unido a través de un enlazador (L) a un ligando GR (Y).

15 **[0537]** Según algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de clase 3 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en una secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 70 a 514, 517 a 534, o 554, opcionalmente con hasta 1, 2, 3, 4, o 5 modificaciones adicionales que retienen agonista de GLP-1 y/o actividad antagonista del glucagón. En ciertas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende los aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 562-760. En algunas realizaciones, el péptido relacionado con glucagón de la clase 3 comprende las secuencias de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1301-1421.

20 *Péptidos relacionados con glucagón de clase 4*

[0538] En ciertas realizaciones, **Q** es un péptido relacionado con glucagón de clase 4 (ver, por ejemplo, Internacional (PCT) Solicitud de Patente N° WO 2009/058662).

25 **[0539]** Todas las secuencias biológicas referencia en la sección siguiente (SEQ ID NOs: 1301-1371) corresponden a SEQ ID NOs: 1-71 en el documento WO 2009/058662.

30 *Actividad*

[0540] Según algunas otras realizaciones, se proporcionan péptidos relacionados con glucagón de clase 4 (en lo sucesivo referido como "péptidos de Clase 4"). En ciertos aspectos, se proporciona un péptido de clase 4 que tiene actividad antagonista del glucagón. A antagonistas de glucagón se pueden usar en cualquier entorno en el que se desea la supresión de agonismo glucagón. El uso más inmediato y obvio sería en el tratamiento de diabetes donde el antagonismo del glucagón se ha demostrado en modelos preclínicos de la hiperglucemia para producir una disminución de la glucosa en sangre. Los antagonistas de glucagón se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad biofísica y/o solubilidad acuosa de los compuestos mientras se mantiene la actividad antagonista del compuesto original. En ciertos aspectos un péptido de clase 4 se define como un antagonista de glucagón puro.

40 **[0541]** El término "antagonista de glucagón" se refiere a un compuesto que contrarresta la actividad del glucagón o previene la función de glucagón. Por ejemplo, un antagonista de glucagón muestra al menos 60% de inhibición (por ejemplo, al menos el 70% de inhibición) y preferiblemente, al menos el 80% de inhibición, de la respuesta máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, las exposiciones antagonistas de glucagón al menos el 90% de inhibición de la respuesta máxima alcanzada por glucagón en el receptor de glucagón. En una realización específica, el antagonista de glucagón muestra una inhibición del 100% de la respuesta máxima conseguida por glucagón en el receptor de glucagón. Además, un antagonista de glucagón a una concentración de aproximadamente 1 micra M muestra menos de aproximadamente 20% de la actividad máxima agonista logrado por glucagón en el receptor de glucagón. En algunas realizaciones, el antagonista de glucagón muestra menos de aproximadamente 10% de la actividad máxima agonista logrado por glucagón en el receptor de glucagón. En una realización específica, el antagonista de glucagón muestra menos de aproximadamente 5% de la actividad máxima agonista logrado por glucagón en el receptor de glucagón. En aún otra realización específica, el antagonista de glucagón muestra 0% de la actividad máxima agonista logrado por glucagón en el receptor de glucagón.

55 **[0542]** Un "antagonista de glucagón puro" es un antagonista de glucagón que no produce ningún tipo de estimulación detectado de actividad del receptor de GLP-1 de glucagón o, como se mide por la producción de AMPc usando un validado en el ensayo de modelo in vitro (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/058662). Por ejemplo, un antagonista de glucagón puro muestra menos de aproximadamente 5% (por ejemplo, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1%, aproximadamente el 0%) de la actividad máxima agonista logrado por glucagón en el receptor de glucagón y muestra menos de aproximadamente 5% (por ejemplo, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2%, menos de aproximadamente 1%, y aproximadamente 0%) de la actividad máxima agonista logrado por GLP-1 en el receptor de GLP-1.

65 **[0543]** Por consiguiente, en algunos aspectos, se proporciona Clase 4 péptidos que muestran actividad antagonista

de glucagón puro. Según algunas realizaciones, la muestra actividad antagonista de glucagón que reduce receptor de glucagón producción de AMPc inducida por glucagón por un máximo de al menos el 50% cuando se pone en contacto el receptor de glucagón simultáneamente con 0,8 nM de glucagón y el antagonista del glucagón, tal como se mide por la producción de AMPc en un ensayo in vitro. En algunas realizaciones, el antagonista de glucagón reduce receptor de glucagón producción de AMPc inducida por glucagón por una cantidad máxima de al menos 80%.

[0544] Los péptidos de clase 4 se cree que son adecuados para cualquier uso que ha sido previamente descrito para antagonistas de glucagón. En consecuencia, los 4 péptidos de clase descritos en el presente documento pueden usarse para tratar la hiperglucemia, o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles elevados de glucagón o los niveles altos de glucosa en sangre. Según algunas realizaciones, el paciente a ser tratado mediante los péptidos de la clase 4 descritos en el presente documento es un animal domesticado, y en otra realización el paciente a ser tratado es un humano. Los estudios sugieren que la falta de supresión de glucagón en pacientes diabéticos contribuye a la hiperglucemia posprandial, en parte, a través de la glucogenólisis acelerada. El análisis de glucosa en la sangre durante una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (OGTT), y en presencia o ausencia de supresión de glucagón somatostatina inducida, ha mostrado un aumento significativo en la glucosa en sujetos con los niveles de glucagón elevados. Por consiguiente, los péptidos de la clase 4 de la presente invención se pueden usar para tratar la hiperglucemia, y se espera que sean útiles para tratar una variedad de tipos de diabetes, incluyendo diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus de tipo II, o diabetes gestacional, ya sea dependiente de la insulina o reducción de las complicaciones de la diabetes, incluyendo nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular no insulino-dependiente.

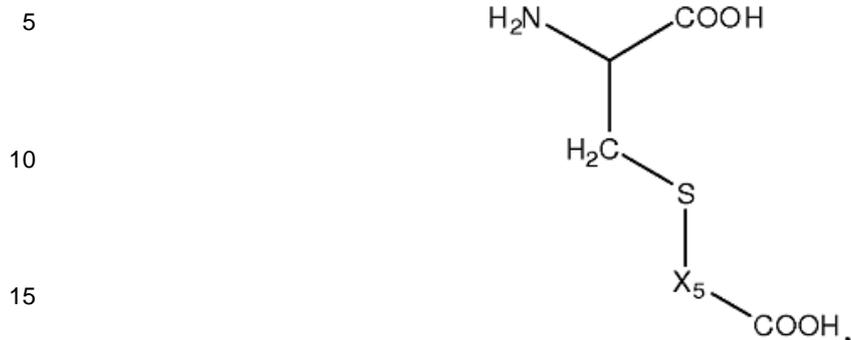
[0545] En algunas realizaciones los diez aminoácidos terminales de la exendina-4 (es decir, la secuencia de SEQ ID NO: 1319 (GPSSGAPPPS)) están unidos al extremo carboxi de un péptido de clase 4. Estas proteínas de fusión se prevé que tenga actividad farmacológica para la supresión del apetito y la inducción de peso mantenimiento/pérdida de peso. Según algunas realizaciones de los péptidos de la clase 4 descritos en el presente documento pueden modificarse adicionalmente para incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1319 (GPSSGAPPPS) unido a ácido 24 del péptido de clase 4 de la SEQ ID NO amino: 1342 y se administró a los individuos para inducir la pérdida de peso o ayudar en el mantenimiento del peso. Más en particular, el péptido de Clase 4 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1302, SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1 304 SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307 , SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1 340 SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342, SEQ ID NO: 1343 y SEQ ID NO: 1344 y que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1319 (GPSSGAPPPS) unida a ácido 24 del péptido de Clase 4 amino está utilizado para suprimir el apetito y la inducción de mantenimiento de la pérdida de peso/peso. En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 administrada comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 346 o SEQ ID NO: 1347.

[0546] Se espera que tales procedimientos para reducir el apetito o promover la pérdida de peso corporal sean útiles en la reducción de peso corporal, la prevención del aumento de peso, o tratar la obesidad de diversas causas, incluyendo la obesidad inducida por fármacos, y la reducción de las complicaciones asociadas con la obesidad, incluyendo la enfermedad vascular (enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, la reperfusión de la isquemia, etc.), hipertensión, aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas.

[0547] Los péptidos de clase 4 de la descripción pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes anti-diabéticos o anti-obesidad. Los agentes anti-diabéticos conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen la insulina, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetoexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirida (Amarilo), o gliclazida (Diamicon); meglitinidas, tales como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas tales como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidinedionas tales como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos), o troglitazona (Rezulin), u otros inhibidores de PPARgamma; inhibidores de la alfa glucosidasa que inhiben la digestión de hidratos de carbono, tales como miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/Glucobay); exenatida (Byetta) o pramlintida; dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) inhibidores tales como vildagliptina o sitagliptina; SGLT (transportador de glucosa dependiente de sodio 1) inhibidores; o la FBPasa (fructosa-1,6-bisfosfatasa) inhibidores.

[0548] Los agentes anti-obesidad conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen supresores del apetito, incluyendo estimulantes de tipo fenetilamina, fentermina (opcionalmente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropión (Tenuate ®), fendimetrazina (Prelu-2 ®, Bontril ®), benzfetamina (Didrex ®), sibutramina (Meridia®, Reductil ®); rimonabant (Acomplia ®), otros antagonistas de los receptores de cannabinoides; oxintomodulina; clorhidrato de fluoxetina (Prozac); Qnexa (topiramato y fentermina), Excalia (bupropión y zonisamida) o Contrave (bupropión y naltrexona), o inhibidores de lipasa, similar a xenical (Orlistat) o Cetilistat (también conocido como ATL-962), o GT 389-255.

[0549] Los péptidos de clase 4 de la descripción también se pueden administrar a pacientes que sufren de pérdida de masa catabólico. Se estima que más de la mitad de los pacientes con cáncer experimentan desgaste catabólico que se caracteriza por la pérdida progresiva de peso no deseado y, debilidad y poca grasa corporal y músculo. El síndrome es igualmente común en pacientes con SIDA y también puede estar presente en las enfermedades bacterianas y parasitarias, artritis reumatoide, y enfermedades crónicas del intestino, el hígado, los pulmones y el



20 en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alquenilo C₂-C₄ o alquinilo C₂-C₄.

25 **[0554]** En una realización específica, el péptido de Clase 4, que comprende la supresión de dos a cinco residuos de aminoácidos del extremo N-terminal y la sustitución de la Asp en la posición 9 del glucagón natural, se modifica adicionalmente mediante hasta tres modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, el péptido de clase 4 puede comprender uno, dos, o tres modificaciones de aminoácidos conservativas. Alternativa o adicionalmente, el péptido de clase 4 puede comprender uno o más aminoácidos modificaciones seleccionadas del grupo que consiste de:

30 A. sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301), o el N- o aminoácido C-terminal del péptido de clase 4 con un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o un grupo alquilo a través de un éster, éter, tioéter, amida o enlace de amina alquilo;

35 B. sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301), o el N- o aminoácido C-terminal de la Clase 4 péptido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetil-fenilalanina (Ac-Phe), en donde el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un resto hidrófilo;

C. adición de un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrófilo a la N- o C-terminal del péptido de clase 4;

40 D. substitutition de Asp en la posición 15 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1301) con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

45 E. sustitución de Ser en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1301) con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

F. sustitución con Aib en una o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301;

50 G. delección del aminoácido en la posición 29 o los aminoácidos en las posiciones 28 y 29, según la numeración de SEQ ID NO: 1301;

H. sustitución de cada uno o ambos de la Asn en la posición 28 y la Thr en la posición 29 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301) con aminoácidos cargados; y/o adición de uno a dos aminoácidos cargados en el extremo C-terminal de SEQ ID NO: 1301;

55 I. sustitución de la Met en la posición 27 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1301) con Leu o norleucina;

J. adición de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 19-21 y 53 a la C-terminal de SEQ ID NO: 1301; en el que Thr en la posición 29 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1301) es Thr o Gly; y

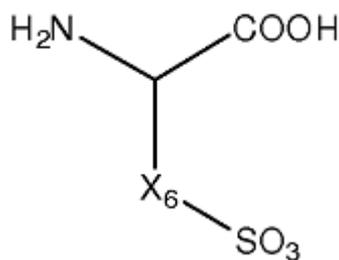
60 K. reemplazo del carboxilato C-terminal con una amida o éster.

65 **[0555]** En una realización específica, el péptido de Clase 4 comprende una modificación de aminoácidos de A, B, o C, como se describe anteriormente, o una combinación de los mismos. En aún otra realización específica, el péptido de Clase 4 comprende además una modificación de aminoácidos de cualquiera de D a K como se ha descrito anteriormente, o una combinación de los mismos, además de la modificación (s) de aminoácidos de A, B, y/o C.

[0556] En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende un péptido de glucagón, en el que los primeros 5 aminoácidos se han eliminado de la N-terminal, y el grupo amino N-terminal restante ha sido sustituido con un grupo hidroxilo (el "análogo PLA6"), produciendo el péptido de SEQ ID NO: 1339. Los solicitantes han encontrado que la sustitución de ácido fenil-láctico por fenilalanina en los análogos de péptidos de clase 4 que tienen los primeros cinco aminoácidos eliminados y la sustitución de un ácido glutámico en la posición 9 (con relación a glucagón natural) mejora aún más la potencia de esas Clase 4 análogos de péptidos.

[0557] En algunas realizaciones de la Clase 4 péptido péptido de SEQ ID NO: 1 339 se modifica adicionalmente mediante la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (la posición 9 de la glucagón natural) con un aminoácido de la estructura general:

5

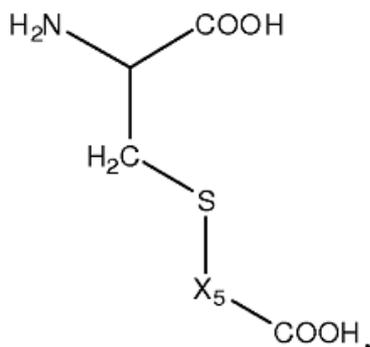


10

15 en la que X_6 es alquilo C_1-C_3 , alqueno C_2-C_3 o alquinilo C_2-C_3 , y en algunas realizaciones X_6 es alquilo C_1-C_3 , y en otro modo de realización X_6 es alquilo C_2 . En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende un péptido de glucagón, en el que los primeros 5 aminoácidos se han eliminado de la N-terminal, y el residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (la posición 9 de la glucagón natural) ha sido sustituido con ácido cisteico o ácido homocisteico. En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende un péptido de glucagón que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1307 y SEQ ID NO: 1308. En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende un amino secuencia de ácido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1308, en el que el aminoácido en la posición cuatro es el ácido homocisteico.

20 [0558] En otra realización, el péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1 339 se modifica adicionalmente mediante la sustitución del residuo de ácido aspártico en la posición cuatro (la posición 9 de la glucagón natural) con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido beta-homoglutámico, o un derivado de alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:

30



35

40

45

en la que X_5 es alquilo C_1-C_4 , alqueno C_2-C_4 o alquinilo C_2-C_4 . En una realización específica, X_5 es C_1 o C_2 alquilo.

50 [0559] Sin embargo, los solicitantes han descubierto que con la sustitución de la fenilalanina N-terminal con PLA en un análogo de glucagón des1-5 (es decir, un análogo de glucagón que tiene los primeros cinco aminoácidos suprimido), más la sustitución del residuo ácido aspártico natural en la posición cuatro (la posición 9 de la glucagón natural) no se requiere para producir un análogo que muestra antagonismo puro. Este resultado es sorprendente a la luz de las enseñanzas de la técnica anterior que el residuo de ácido aspártico natural en la posición cuatro deben sustituido para producir alta afinidad y antagonistas potentes de glucagón (2-29) análogos. El uso de la sustitución PLA mejora la potencia relativa del análogo de Asp9 a un punto comparable a la de la Glu9 y hCys (SO 3H) 9 análogos.

55 [0560] La sustitución del residuo de fenilalanina con otros análogos de fenilalanina, incluyendo 3,4-2F-phenylalanine (3,4-2F-Phe), 2-naphthylalanine (2-Nal), N-acil-fenilalanina (Ac-Phe), ácido alfa-metilhidrocinámico (MCA) y ácido bencilmalónico (BMA) no realizaron como potentemente como la sustitución de PLA.

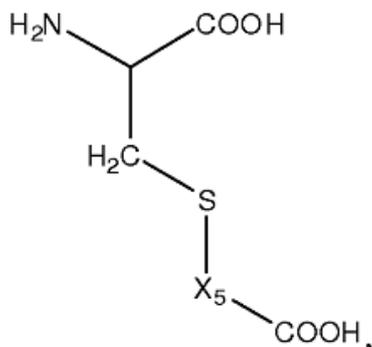
60

65 [0561] La sustitución de PLA en sitios distintos de en la posición seis (según la numeración de aminoácidos del glucagón natural), incluyendo en las posiciones 4 y 5 revela que el análogo PLA6 es un antagonista apreciablemente más potente que análogos de glucagón tiene un N- ligeramente extendida término. La presente descripción también incluye análogos en los que el grupo amino N-terminal está sustituido con un acilados y alquilados péptidos "O-terminal".

[0562] Además, la sustitución PLA6 no sólo aumenta la potencia del antagonista, sino también sirve un papel crítico en la pegilación. Los análogos PLA6 se pueden PEGilar selectivamente sin restauración de agonismo glucagón. En ausencia de la sustitución PLA, pegilación del análogo sorprendentemente induce agonismo glucagón. Este agonismo glucagón no se ve en los análogos PLA6 pegilado. Varios sitios de pegilación se investigaron incluyendo las posiciones 3, 6 y 19 (posiciones 8, 11 y 19 de glucagón natural) y en el residuo de aminoácido N-terminal. En algunas realizaciones, la pegilación está en la posición 19 (posición 24 del glucagón natural) como ese sitio muestra el antagonismo del glucagón más potente y selectivo.

[0563] En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende la estructura general de ABC, en donde A se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) ácido fenil láctico (PLA);
- (ii) un derivado de oxi de PLA;
- (iii) un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter; B representa aminoácidos i a 26 de la SEQ ID NO: 1301, en el que i es 3, 4, 5, 6, o 7, que comprende opcionalmente uno o más modificaciones de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:
- (iv) Asp en la posición 9 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301) está sustituido con un Glu, un derivado de ácido sulfónico de Cys, ácido homoglutámico, ácido beta-homoglutámico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en el que X₅ es alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄.

(v) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301) con un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo a través de un éster, éter, tioéter, amida, o alquilo amina unión;

(vi) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301) con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetil-fenilalanina (Ac-Phe), en donde el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un resto hidrófilo;

(vii) Asp en la posición 15 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1301) está sustituido con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(viii) Ser en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1301) está sustituido con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(ix) sustitución con Aib en una o más de las posiciones 16, 20, 21, y 24 según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1301; y C se selecciona del grupo que consiste en:

(x) X;

(xi) XY;

(xii) XYZ; y

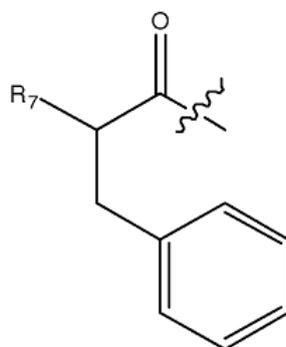
(xiii) XYZ-R10, en el que X es Met, Leu, Nle o; Y es Asn o un aminoácido cargado; Z es Thr, Gly, Cys, Lys, ornitina (Orn), homocisteína, fenilalanina acetilo (Ac-Phe), o un aminoácido cargado; en el que R10 se selecciona de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1319-1321 y 1353; y

(xiv) cualquiera de (x) a (xiii) en la que el carboxilato C-terminal se sustituye con una amida.

[0564] En un aspecto específico, el péptido de Clase 4 comprende un derivado de oxi de PLA. Tal como se usa en el presente documento "oxi-derivado de PLA" se refiere a un compuesto que comprende una estructura modificada de PLA en la que el grupo hidroxilo ha sido sustituido con OR 11, en el que R11 es un resto químico. A este respecto, el derivado de oxi de PLA puede ser, por ejemplo, un éster de PLA o un éter de PLA.

[0565] Los procedimientos para preparar derivados oxi de PLA son conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el derivado de oxi es un éster de PLA, el éster puede formarse por tras la reacción del hidroxilo de PLA con un

carbonilo que lleva un nucleófilo. El nucleófilo puede ser cualquier nucleófilo adecuado, incluyendo, pero no limitado a una amina o hidroxilo. En consecuencia, el éster de PLA puede comprender la estructura de Fórmula IV:



Fórmula IV

en la que R7 es un éster formado por reacción del hidroxilo de PLA con un carbonilo que lleva un nucleófilo.

[0566] El carbonilo que lleva un nucleófilo (que reacciona con el hidroxilo de PLA para formar un éster) puede ser, por ejemplo, un ácido carboxílico, un derivado de ácido carboxílico, o un éster activado de un ácido carboxílico. El derivado de ácido carboxílico puede ser un cloruro de acilo, un anhídrido de ácido, una amida, un éster, o un nitrilo. El éster activado de un ácido carboxílico puede ser, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), tosilato (Tos), una carbodiimida, o un hexafluorofosfato. En algunas realizaciones, la carbodiimida es 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), o 1,3-diisopropilcarbodiimida (DICD). En algunas realizaciones, el hexafluorofosfato se selecciona de un grupo que consiste en hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris (dimetilamino) fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato (HATU), y O-benzotriazol-N, N, N', N'-tetrametil-uronio hexafluorofosfato (HBTU).

[0567] Los procedimientos para preparar éteres a partir de la reacción con un grupo hidroxilo (por ejemplo, el hidroxilo de PLA) son también conocidos en la técnica. Por ejemplo, el grupo hidroxilo de PLA puede hacerse reaccionar con un alquilo halogenado o tosilado alcohol de alquilo para formar un enlace éter.

[0568] Generalmente, el resto químico de R 11 es uno que no disminuya la actividad del péptido de clase 4. En algunas realizaciones, el resto químico aumenta la actividad, estabilidad y/o solubilidad del péptido de clase 4.

[0569] En una realización específica, el resto químico unido a PLA través de un enlace que contiene oxígeno (por ejemplo, a través de un enlace éster o éter) es un polímero (por ejemplo, un polialquilenglicol), un carbohidrato, un aminoácido, un péptido, o un lípido, por ejemplo, un ácido graso o un esteroide.

[0570] En una realización específica, el resto químico es un aminoácido, que, opcionalmente, es una parte de un péptido, de manera que la Fórmula IV es un depsipéptido. En este sentido, PLA puede estar a una posición distinta de la de residuos de aminoácidos N-terminal del péptido de Clase 4, de manera que el péptido de Clase 4 comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) aminoácidos N-terminal al residuo PLA. Por ejemplo, el péptido de clase 4 puede comprender PLA en la posición n, donde n es 2, 3, 4, 5, o 6 del péptido de clase 4.

[0571] Los aminoácidos N-terminales al residuo PLA pueden ser sintéticos o de origen natural. En una realización específica, los aminoácidos que son N-terminal PLA son de origen natural aminoácidos. En algunas realizaciones, los aminoácidos que son N-terminal a PLA son los aminoácidos N-terminales de glucagón natural. Por ejemplo, el péptido de clase 4 puede comprender en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1354-58, en el que PLA está unida a treonina mediante un enlace éster:

- SEQ ID NO: 1354 Su-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1355 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1356 Gln-Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1357 Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1358 Thr-PLA

[0572] En una realización alternativa, uno o más de los aminoácidos N-terminales pueden estar sustituidos con un aminoácido distinto del de aminoácidos del glucagón natural. Por ejemplo, cuando el péptido de Clase 4 comprende PLA como el aminoácido en la posición 5 o 6, el aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un

aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 1 del péptido de Clase 4 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), histidina N-metilo, histidina alfa-metilo, imidazol ácido acético, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, alanina N-metilo, y aminoácidoisobutírico (Aib). También, por ejemplo, cuando el péptido de Clase 4 comprende PLA como el aminoácido en la posición 4, 5, o 6, el aminoácido en la posición 3 del péptido a clase 4 puede ser ácido glutámico, en contraposición al residuo glutamina natural de natural glucagón. En una realización de ejemplo de la invención, el péptido de Clase 4 comprende en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1359-1361.

[0573] Con respecto a la clase de 4 péptidos que comprenden un compuesto de Fórmula IV, el polímero puede ser cualquier polímero, siempre que pueda reaccionar con el grupo hidroxilo de PLA. El polímero puede ser uno que de forma natural o comprende normalmente un carbonilo que lleva un nucleófilo. Alternativamente, el polímero puede ser uno que se derivatizó a comprender el carbonilo que lleva el carbonilo. El polímero puede ser un polímero derivatizado de cualquiera de: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros de polivinilo, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo) y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo celulosa alquilo, hidroxialquilo celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, celulosas nitro, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil cellulose, celulosa hidroxibutilo metilo, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, celulosa carboxietil, triacetato de celulosa, y sal de sodio de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), y poli(tereftalato de etileno), y poliestireno.

[0574] El polímero puede ser un polímero biodegradable, que incluye un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto-ésteres), poliuretanos, poli(ácido Butic), poli(ácido valérico), y poli(lactida-cocaprolactone)), y un polímero biodegradable natural (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones de rutina hechas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilos (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea por hidrólisis enzimática o la exposición al agua *in vivo*, por erosión superficial o en masa.

[0575] El polímero puede ser un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por HS Sawhney, CP Pathak y JA Hubbell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, los ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutin, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(lauril metacrilato), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

[0576] En algunas realizaciones, el polímero es un polímero soluble en agua. polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, etilcelulosa hidroxipropilo, butylcellulose hidroxipropilo, pentylcellulose hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa (Ethocel), celulosa de hidroxietilo, varios alquilo Celulosas y celulosas de hidroxialquilo, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, acetato de vinilo/copolímeros de ácido crotonico, metacrilato de poli-hidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido polimetacrílico, polimetilmetacrilato, copolímeros de vinil éter/anhídrido maleico de metilo, alcohol de polivinilo, ácido poliacrílico de sodio y de calcio, ácido poliacrílico, polímeros de carboxi ácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxietileno polioxipropileno, polymethylvinylether co-maleico anhídrido paseo, carboximetilamida, potasio metacrilato de divinilbenceno co-polímero, polioxietilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

[0577] En una realización específica, el polímero es un glicol de polialquileno, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

[0578] El hidrato de carbono puede ser cualquier hidrato de carbono a condición de que comprende o está hecho para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. El hidrato de carbono, por ejemplo, puede ser uno que ha sido derivado para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. En este sentido, el hidrato de carbono puede ser una forma derivatizada de un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, la rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (a almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidan, galactomanano.

[0579] Con respecto a la clase de 4 péptidos que comprenden un compuesto de Fórmula IV, el lípido puede ser cualquier lípido que comprende un carbonilo con un grupo saliente alfa. El lípido, por ejemplo, puede ser uno que se derivatiza a comprender el carbonilo. En este sentido, el lípido, puede ser un derivado de un ácido graso (por ejemplo, un ácido graso C₄-C₃₀, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano, etanolamina N-acilo), glicerolípido (por ejemplo, mono-, di-, tri glicerol sustituidas), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ejemplo, la esfingosina, ceramida), esteroles de lípidos (por ejemplo, esteroides, colesterol), lípidos prenol, saccharolípido, o un policétido. En algunas realizaciones, el lípido es un aceite, cera, colesterol, esteroides, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

[0580] En algunas realizaciones, R⁷ tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa o menos, por ejemplo, aproximadamente 90 kDa o menos, aproximadamente 80 kDa o menos, aproximadamente 70 kDa o menos, aproximadamente 60 kDa o menos, aproximadamente 50 kDa o menos, aproximadamente 40 kDa o menos. Según ello, R⁷ puede tener un peso molecular de aproximadamente 35 kDa o menos, aproximadamente 30 kDa o menos, aproximadamente 25 kDa o menos, aproximadamente 20 kDa o menos, aproximadamente 15 kDa o menos, aproximadamente 10 kDa o menos, aproximadamente 5 kDa o menos, o aproximadamente 1 kDa.

[0581] En una realización alternativa, el péptido de Clase 4 comprende como A, un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter. El enlace éster o éter puede ser, por ejemplo, entre los aminoácidos 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5, o 5 y 6. Opcionalmente, el péptido puede ser modificado adicionalmente mediante enlace covalente a otro resto químico que incluye la unión con un polímero (por ejemplo, un polímero hidrófilo), alquilación, o acilación.

[0582] Con respecto al péptido de Clase 4, que comprende la estructura general ABC, B representa aminoácidos de glucagón natural, por ejemplo, i a 26 de la SEQ ID NO: 1301, en el que i es 3, 4, 5, 6, o 7, que comprende opcionalmente uno o más modificaciones de aminoácidos. En una realización específica, B representa los aminoácidos 7 a 26 de la SEQ ID NO: 1301, opcionalmente modificado adicionalmente.

[0583] En algunas realizaciones, B es modificado por hasta tres modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, B, que representa la secuencia de aminoácidos natural de la SEQ ID NO: 1 301 es modificado por una o más modificaciones de aminoácidos conservativas.

[0584] En otra realización, B comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en (iv) a (ix), como se describe en el presente documento. En una realización específica, B comprende una o ambas de las modificaciones de aminoácidos (V) y (VI). En una realización específica adicional, B comprende uno o una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (iv), (vii), (viii) y (ix), además de (v) y (vi).

[0585] En otra realización específica, el péptido de Clase 4 comprende uno o más aminoácidos cargados en el extremo C-terminal. Por ejemplo, Y y/o Z puede ser un ácido cargado amino, por ejemplo, Lys, Arg, His, Asp, y Glu. En aún otra realización, el péptido de Clase 4 comprende uno o dos aminoácidos cargados (por ejemplo, Lys, Arg, His, Asp, y Glu)C-terminal a la Z. En un aspecto específico, Z seguido de uno a dos aminoácidos cargados no comprende R10.

[0586] El péptido de clase 4 en algunas realizaciones comprende un resto hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido del péptido de Clase 4, como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el péptido de clase 4 puede comprender un resto hidrófilo unido covalentemente a un aminoácido en la posición 1, 16, 20, 21, o 24 según la numeración de SEQ ID NO: 1301. En otra realización, se adjunta la fracción hidrófila al aminoácido C-terminal del péptido de Clase 4, que en algunos casos, es de 1 o 11 aminoácidos C-terminal a la Z. en otra realización más, el resto hidrófilo se une a PLA, cuando a es PLA, PLA Phe, o PLA-Thr-Phe, en el que PLA está modificado para comprender el resto hidrófilo. En otra realización, se añade un aminoácido que comprende un resto hidrófilo a la N- o C-terminal del péptido de clase 4. En otra realización, el péptido de Clase 4 comprende un grupo acilo o un grupo alquilo como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la acilación o alquilación puede tener lugar fuera de la cadena lateral del aminoácido en la posición 10, 20, o 24, según la numeración de SEQ ID NO: 1301. En una realización alternativa, la acilación o alquilación ocurre fuera de la cadena lateral del aminoácido C-terminal del péptido de Clase 4, que en algunos casos, es de 1 o 11 aminoácidos C-terminal a la Z. en otra realización más, cuando a es PLA, PLA-Phe, o PLA-Thr-Phe, el PLA se modifica para comprender un grupo acilo o alquilo.

Realizaciones de ejemplo

[0587] El péptido de clase 4 puede comprender cualquier aminoácido, sintéticas o de origen natural, siempre que al menos dos aminoácidos consecutivos de la péptido están unidos a través de un enlace éster o éter. En una realización específica, el péptido comprende los aminoácidos del glucagón natural. Por ejemplo, el péptido puede comprender j a 6 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1301), en el que j es 1, 2, 3, 4, o 5. Alternativamente, el péptido

puede comprender una secuencia de aminoácidos basado en la N- terminal de SEQ ID NO: 1301 con una o más modificaciones de aminoácidos. El aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Por ejemplo, el péptido puede comprender en la posición 1 del péptido de Clase 4 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), histidina N-metilo, histidina alfa-metilo, imidazol ácido acético, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, alanina N-metilo, y aminoácidoisobutírico (Aib). También, por ejemplo, el aminoácido en la posición 3 del péptido de clase 4 puede ser ácido glutámico, en contraposición al residuo glutamina natural de glucagón natural. En consecuencia, el péptido de clase 4 puede comprender una secuencia de aminoácidos de:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 1368);

Xaa2-Xaa3-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 1369); o

Xaa3-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 1370); en la que Xaa1 se selecciona de un grupo que consiste en: His, D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), N-metil histidina, histidina alfa-metilo, ácido acético imidazol, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil- histidina y homo-histidina; Xaa2 se selecciona de un grupo que consiste en: Ser, D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, alanina N-metilo, y aminoácidoisobutírico (Aib); y Xaa3 es Gln o Glu.

[0588] La descripción también abarca realizaciones en las que el aminoácido C-terminal de los péptidos de la clase 4 tienen un grupo amida sustituyendo el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural.

[0589] En algunas realizaciones, en donde el péptido de Clase 4 está PEGilado, el péptido de Clase 4 comprende los péptidos de glucagón acortados, específicamente 6-29 donde el aminoácido "N-terminal" es PLA (ácido fenil-láctico). Tales derivados de glucagón muestran virtudes únicas. Son péptidos más potentes que los de la fenilalanina natural N-terminal y suprimen cualquier agonismo glucagón que resulta de pegilación, algo que no se ve con la fenilalanina natural. Por último, aunque la literatura actual establece que se requiere una sustitución del ácido aspártico natural en la posición 9 para la actividad antagonista, los solicitantes han descubierto el sorprendente resultado de que tal sustitución ya no se requiere en el PLA6- (6-29) análogos de glucagón.

[0590] En algunas realizaciones un aminoácido del péptido de Clase 4 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, incluyendo, por ejemplo, maleimido, sulfona de vinilo, 2-piridiltio, haloalquilo, y haloacilo. Estos reactivos reactivos tiol pueden contener carboxi, ceto, hidroxilo y grupos éter, así como otros restos hidrófilos tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, un aminoácido del péptido de clase 4 se sustituye con lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina sustituyendo se modifica adicionalmente utilizando amina reactivos reactivos, tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc.) de ácidos carboxílicos o aldehídos de restos hidrófilos tales como polietilenglicol. Según algunas realizaciones, el residuo de lisina correspondiente a la posición 12 del péptido natural está sustituido con arginina y se inserta una única sustitución de lisina por uno de los aminoácidos correspondientes a la posición 1, 16, 17, 20, 21, 24 o 29 de el péptido natural, o una lisina se añade a la N- o C-terminal del péptido de clase 4.

[0591] En otra realización, el residuo de metionina correspondiente a la posición 27 del péptido natural se cambia a leucina o norleucina para evitar la degradación oxidativa del péptido.

[0592] En algunas realizaciones, los 4 péptidos clase descrita en el presente documento se modifican adicionalmente por truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos de la C-terminal del péptido de glucagón (es decir, el truncamiento de los aminoácidos en la posición 29 o en las posiciones 28 y 29 del glucagón natural) sin afectar la actividad y/o la potencia en el receptor de glucagón. A este respecto, el péptido de clase 4 descrito en el presente documento puede, por ejemplo, consistir esencialmente en o consistir en los aminoácidos 1-27, 1-28, 2-27, 2-28, 3-27, 3-28, 4-27, 4-28, 5-27, 5-28, 6-27, 6-28 o del péptido de glucagón natural (SEQ ID NO: 1301) con una o más modificaciones que dan lugar a la actividad peptídica de clase 4 como se describe en el presente documento.

[0593] Los péptidos de lcase 4 aquí descritos también abarcan sustituciones de aminoácidos en las posiciones que se sabe que no son críticas para la función del péptido de glucagón. En algunas realizaciones las sustituciones son sustituciones de aminoácidos conservativas en uno, dos o tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22, 23 o 24 de la SEQ ID NO: 1339. en algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende un péptido derivado de la SEQ ID NO: 1342 en el que el péptido de glucagón comprende un adicional de aminoácidos de sustitución con respecto a SEQ ID NO: 1342 en una a tres posiciones de aminoácidos seleccionados de las posiciones 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14. En algunas realizaciones, las sustituciones en las posiciones 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14 de la SEQ ID NO: 1342 son amino conservativa sustituciones de aminoácidos. En algunas realizaciones, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 o 29 del péptido natural, y más particularmente en la posición 21 y/o 24 están sustituidos con cisteína o lisina, donde una cadena de PEG está unida covalentemente a la cisteína sustituido o residuo de lisina.

[0594] Según algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 modificada comprende dos o más cadenas de

polietilenglicol unidos covalentemente al péptido en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones el péptido pegilado Clase 4 comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1312, y SEQ ID NO: 1322, en el que dicho péptido comprende una cadena de polietilenglicol unido al aminoácido en las posiciones 11 y 19 y el peso molecular combinado de los dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons.

[0595] Según algunas otras realizaciones se proporciona un péptido de clase 4 que comprende un péptido de glucagón modificado seleccionado del grupo que consiste en: (ver diagramm) (ver diagramm)

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 1309),

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr- R₂ (SEQ ID NO: 1310),

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa Tyr-Leu-Asp-Ser-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 1311) y

R₁-Phe- Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Xaa-Tyr-Leu-Asp-Ser- Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr- R₂ (SEQ ID NO: 1312),

en donde Xaa en la posición 4 = ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o el ácido homocisteico, Xaa en la posición 7 = Lys o Arg, Xaa en la posición 10 es ácido aspártico, ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico; Xaa en la posición 11 es Ser, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetilo fenilalanina, Xaa en la posición 16 es Asp, Lys, Cys, Orn, homocisteína o fenilalanina acetil una y Xaa en la posición 19 es Gln, Lys, Cys, Orn, homocisteína y fenilalanina acetilo, Xaa en la posición 22 = Met, Leu o Nle, R₁ es OH o NH₂, y R₂ es COOH o CONH 2, en el que el péptido se pegilado en la posición 11 para la SEQ ID NO: 1309, en la posición 16 para la SEQ ID NO: 1 310, la posición 19 de SEQ ID NO: 1311 y en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 1312, con la condición de que cuando Xaa en la posición 4 = ácido aspártico entonces R₁ es OH. Según algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1 310 o SEQ ID NO: 1311, en el que R₁ es OH y R₂ es CONH 2. En algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1 310 o SEQ ID NO: 1311, en el que R₁ es OH, R₂ es CONH 2 y el aminoácido en la posición 4 es el ácido aspártico, y en una realización adicional dichos péptidos comprenden un carboxi extensión terminal que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1319.

[0596] Según algunas realizaciones, el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1313, SEQ ID NO: 1314, y SEQ ID NO: 1316, en el que el péptido se pegilado en la posición 11 para la SEQ ID NO: 1309 y SEQ ID NO: 1313, pegilado en la posición 16 para la SEQ ID NO: 1310, y pegilado en la posición 19 para la SEQ ID NO: 1310 y SEQ ID NO: 1314. en algunas realizaciones, el agonista de glucagón comprende el péptido de SEQ ID NO: 1 313 o SEQ ID NO: 1314. en algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal de los péptidos de la clase 4 descritos en el presente documento tienen un grupo amida en lugar del grupo de ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural. Según algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1318.

[0597] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un péptido de Clase 4, en el que una proteína de plasma se ha unido covalentemente a una cadena lateral de aminoácidos del péptido para mejorar la solubilidad, estabilidad y/o la farmacocinética del péptido de glucagón. Por ejemplo, la albúmina de suero puede unirse covalentemente a la clase de 4 péptidos presentados en el presente documento. En algunas realizaciones, la proteína plasmática se une covalentemente a un aminoácido correspondiente a la posición 16, 17, 20, 21, 24 o 29 del péptido glucagón natural. Más particularmente, en algunas realizaciones, la proteína de plasma se une a un aminoácido correspondiente a la posición 16 o 24 del péptido glucagón natural, en el que el péptido de Clase 4 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1304, SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1322, SEQ ID NO: 1323, SEQ ID NO: 1324, SEQ ID NO: 1325, SEQ ID NO: 1326, SEQ ID NO: 1327, SEQ ID NO: 1328, SEQ ID NO: 1336 y SEQ ID NO: 1339. En algunas realizaciones de la Clase 4 péptido comprende un péptido seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311 y SEQ ID NO: 1312.

[0598] Según algunas realizaciones, se proporciona un péptido de clase 4 en el que una secuencia de aminoácidos lineal que representa la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina se ha unido covalentemente a una cadena

lateral de aminoácidos de un péptido de clase 4 descrito en la presente para mejorar la solubilidad, la estabilidad y/o farmacocinética del péptido de glucagón. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos que representa la parte Fc de una molécula de inmunoglobulina puede unirse covalentemente a la posición 11, 12, 15, 16, 19, 21 o 24 del péptido de glucagón de la SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1339, o un análogo del glucagón de la misma. En algunas realizaciones el péptido Fc se une covalentemente a la posición 11 o 19 del péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308 o SEQ ID NO: 1336. La parte Fc es generalmente aislado de IgG, pero el fragmento de péptido Fc de cualquier inmunoglobulina debe funcionar de forma equivalente. En algunas realizaciones, el péptido de glucagón se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1304, SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, y SEQ ID NO: 1339, en la que la parte Fc está ligado a la posición correspondiente de E¹⁶, 17, 20, 21, 24 o 29 del péptido glucagón natural. En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311 y SEQ ID NO: 1312, donde el péptido Fc se une a la parte cadena del aminoácido situado en la posición 11, 16 o 19 de la SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311, respectivamente, y en ambas posiciones 11 y 19 de SEQ ID NO: 1312.

[0599] En ciertas realizaciones de la descripción, el péptido de Clase 4 comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1362, 1364 a 1367, y 1371.

Modificaciones para mejorar la solubilidad,

[0600] Los péptidos de clase 4 se pueden modificar adicionalmente para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras que, en algunos aspectos reteniendo una actividad antagonista del glucagón. La introducción de grupos hidrófilos en las posiciones correspondientes a las posiciones 1, 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido natural, o en el C-terminal, puede mejorar la solubilidad del péptido de clase 4 resultante en soluciones que tienen un pH fisiológico, al tiempo que conserva el padre compuestos actividad antagonista. Por lo tanto, en algunas realizaciones las actualmente descritas Clase 4 péptidos se modifican adicionalmente para comprender uno o más grupos hidrófilos unidos covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 1, 16, 17, 20, 21, 24 y 29 del péptido de glucagón natural o del aminoácido N- o C-terminal. En una realización adicional las cadenas laterales de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 16 y 24 del péptido glucagón natural están unidos covalentemente a grupos hidrófilos, y en algunas realizaciones el grupo hidrófilo es polietilenglicol (PEG).

[0601] Los solicitantes también han descubierto que el glucagón natural puede ser modificado mediante la introducción de carga en su extremo carboxi para mejorar la solubilidad del péptido al tiempo que conserva las propiedades agonistas del péptido. La solubilidad mejorada permite la preparación y almacenamiento de soluciones de glucagón a pH casi neutro. La formulación de soluciones de glucagón a valores de pH relativamente neutro (por ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0) mejora la estabilidad a largo plazo de los péptidos de la clase 4.

[0602] Una vez más, los solicitantes anticipan que los péptidos de la clase 4 descritos en el presente documento pueden modificarse de manera similar para mejorar su solubilidad en soluciones acuosas a pH relativamente neutro (por ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0) al tiempo que conserva las propiedades antagonistas de la proteína precursor. Por consiguiente, algunas realizaciones de la presente invención se dirige a un péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1339 que ha sido modificado aún más con respecto a los aminoácidos naturales presentes en las posiciones 6-29 de la glucagón de tipo natural (SEQ ID NO: 1301) añadir carga al péptido por la sustitución de ácidos naturales no cargados aminoácidos con aminoácidos cargados, o la adición de aminoácidos cargados al extremo carboxi. Según algunas otras realizaciones, uno a tres de los aminoácidos naturales no cargados del péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1339 se sustituyen con un aminoácido cargado. En algunas realizaciones, el aminoácido cargado se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico. Más en particular, los solicitantes han descubierto que sustituyendo el aminoácido que se produce normalmente en la posición 28 y/o 29 con respecto al glucagón natural con aminoácidos cargados correspondiente, y/o la adición de uno a dos aminoácidos cargados en el término carboxi de la Clase 4 péptido, mejora la solubilidad y la estabilidad de los péptidos de la clase 4 en soluciones acuosas a pHs fisiológicamente relevantes (es decir, un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5). En consecuencia, se prevé que tales modificaciones del péptido de clase 4 descrito en la presente para tener un efecto similar sobre la solubilidad en soluciones acuosas, particularmente a un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, al tiempo que conserva la actividad biológica del péptido precursor.

[0603] Según algunas realizaciones, el péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1339 se modifica mediante la sustitución del aminoácido natural en la posición 28 y/o 29 con respecto al glucagón natural con un aminoácido cargado negativamente correspondiente (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 del péptido. En una realización alternativa el péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1339 se modifica mediante la sustitución del aminoácido natural en la posición correspondiente 29 con respecto al glucagón natural con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) y opcionalmente el Además de uno o dos aminoácidos con carga positiva (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en el extremo carboxi terminal del

péptido. Según algunas otras realizaciones un péptido de clase 4 que tiene una mejor solubilidad y estabilidad se proporciona en el que el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1341 con la condición de que al menos uno aminoácidos en la posición, 23, o 24 de la SEQ ID NO : 1341 está sustituido con un aminoácido ácido, y/o se añade un aminoácido ácido adicional en el extremo carboxi de la SEQ ID NO: 1341. en algunas realizaciones, los aminoácidos ácidos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico.

[0604] Según algunas otras realizaciones una clase 4 péptido que tiene una mejor solubilidad y estabilidad se proporciona en el que el antagonista comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342, SEQ ID NO: 1 343 o SEQ ID NO: 1344, en el que al menos uno de los aminoácidos en las posiciones 23 o 24 está sustituido con un residuo de aminoácido no natural (es decir, al menos un aminoácido presente en la posición 23 o 24 del análogo es un aminoácido ácido diferente de la amino ácido presente en la posición correspondiente en SEQ ID NO: 1307). Según algunas otras realizaciones se proporciona un agonista de glucagón comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1341 o 1342 con la condición de que cuando el aminoácido en la posición 23 es asparagina y el aminoácido en la posición 24 es treonina, el péptido además uno comprende a dos aminoácidos, seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp o Glu, añadido al extremo carboxilo terminal del péptido de clase 4.

[0605] En otra realización, la solubilidad del péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1 342 se puede mejorar mediante la unión covalente de un resto hidrófilo por un residuo de aminoácido en la posición 11, 12, 15, 16, 19 o 24, y, en algunas realizaciones, el resto hidrófilo está unido a un aminoácido en la posición 11, 16 o 19, y en una realización adicional el resto hidrófilo está ligada al ácido 19. en algunas realizaciones, el resto hidrófilo es una proteína plasmática o la parte Fc de una inmunoglobulina amino , y en una realización alternativa el resto hidrófilo es una cadena hidrocarbonada hidrófila. En algunas realizaciones, el resto hidrófilo es polietilenglicol, que tiene un peso molecular seleccionado de entre el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En otra realización, el resto hidrófilo es polietilenglicol, que tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 20.000 Daltons. En algunas realizaciones el polietileno modificado Clase 4 péptido comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1343, SEQ ID NO: 1344 o SEQ ID NO: 1345.

Modificaciones para mejorar la estabilidad,

[0606] La secuencia Asp-Ser en la posición 15-16 de glucagón natural ha sido identificado como un dipéptido única inestable que conduce a la escisión química prematura de la hormona natural en tampones acuosos. Por ejemplo, cuando se mantiene a 0,01 N HCl a 37 oC durante 2 semanas, más del 50% de la glucagón natural se puede escindir en fragmentos. Los dos péptidos de escisión liberadas 1-15 y 16-29 están desprovistos de actividad biológica similar al glucagón y por lo tanto representan una limitación de la pre-formulación acuosa de glucagón y sus análogos relacionados. La sustitución química selectiva de la Asp en la posición 15 del péptido de glucagón natural con Glu ha observado para eliminar virtualmente la escisión química del enlace 15-16 péptido.

[0607] Por consiguiente, se espera que los péptidos de la clase 4 de la presente invención pueden modificarse de manera similar para disminuir su susceptibilidad a la escisión química prematura en tampones acuosos. Según algunas realizaciones de los péptidos de la clase 4 descritos en el presente documento pueden modificarse adicionalmente para aumentar su estabilidad en soluciones acuosas mediante la sustitución del aminoácido aspártico natural, situado en la posición 15 del péptido de glucagón natural, con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico. Según algunas otras realizaciones el residuo de ácido aspártico en la posición 10 del péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1339 puede estar sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, y en algunas realizaciones, el ácido aspártico natural en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1339 se sustituye con ácido glutámico. Según algunas otras realizaciones se proporciona un péptido 4 Clase que tiene una estabilidad mejorada en soluciones acuosas en el que el antagonista comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1340 y SEQ ID NO: 1342. En otra realización, el péptido de Clase 4 está amidado.

[0608] Según algunas otras realizaciones, el aumento de la estabilidad a modo de reducción de la degradación del péptido de clase 4 se describe en el presente documento también se puede conseguir mediante la sustitución de la serina en la posición 16 (según la numeración de glucagón natural) con ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homoglutámico, o ácido homo-cisteico. En una realización específica, la serina en la posición 16 (según el glucagón secuencia de numeración natural) se sustituye con ácido glutámico. En un aspecto más específico, el péptido de Clase 4, que comprende una modificación de este tipo comprende un carboxilato C-terminal y no está amidado.

[0609] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un péptido de clase 4 que comprende un péptido de glucagón seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1340, SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342, SEQ ID NO: 1343 y SEQ ID NO: 1344, modificado adicionalmente por una o más sustituciones adicionales de aminoácidos en posiciones correspondientes a las posiciones 11, 12, 15, 16, 19 y/o 24 del péptido glucagón natural, en el que las sustituciones de aminoácidos comprenden una sustitución

con un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo por ejemplo, PEG. El péptido puede estar sustituido con un aminoácido de origen natural o sintético (de origen no natural) de aminoácidos. Sintético o de origen no natural aminoácidos se refieren a aminoácidos que no ocurren de forma natural *in vivo* pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas aquí. En algunas realizaciones se proporciona un péptido de clase 4 en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1340, SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342, SEQ ID NO: 1343 y SEQ ID NO: 1344, y comprende además una cadena de polietilenglicol unido a la posición correspondiente 21 o 24 del péptido de glucagón natural. En una realización adicional, el C-terminal del péptido de clase 4 se modifica para reemplazar el grupo ácido carboxílico con un grupo amida.

Péptidos de fusión y conjugados

[0610] La presente divulgación también abarca los péptidos de la clase 4 de fusión péptido en el que un segundo péptido se ha fusionado con el C-terminal del péptido de clase 4. Más en particular, el péptido de fusión puede comprender un péptido de péptidos de clase 4 de la SEQ ID NO: 1344 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1319 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 1320 (Lys Arg Asn Arg Asn Ile Ala) o SEQ ID NO: 1321 (Lys Arg Asn Arg) unido a la amino ácido C-terminal del péptido de clase 4. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1319 (GPSSGAPPPS) está unido al aminoácido 24 del péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1342 a través de un enlace peptídico. En otra realización, el péptido de fusión comprende un péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1340, SEQ ID NO: 1341 o SEQ ID NO: 1343 que además comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1319 (GPSSGAPPPS) unido a ácido 24 del péptido de Clase 4 amino. En otra realización, el péptido de fusión comprende un péptido de clase 4 de la SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1337, SEQ ID NO: 1338, SEQ ID NO: 1339, SEQ ID NO: 1341 o SEQ ID NO: 1343 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1320, SEQ ID NO: 1321 o SEQ ID NO: 1353 ligado a ácido 24 del péptido de Clase 4 amino. En algunas realizaciones, el péptido de fusión 4 péptido de Clase comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1346 y SEQ ID NO 1347. En una realización adicional, el extremo C-terminal del péptido de fusión está modificada para sustituir el grupo ácido carboxílico con un grupo amida.

[0611] En algunas realizaciones se proporciona un péptido de fusión 4 péptido de clase en el que la parte de péptido de clase 4 del péptido de fusión se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1304, SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1313, SEQ ID NO: 1314, SEQ ID NO : 1315, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1316, SEQ ID NO: 1317, SEQ ID NO: 1318 y SEQ ID NO: 1339 y la secuencia de la SEQ ID NO: 1319 se fusiona con el extremo carboxilo terminal de la Clase 4 parte de péptido, y en el que la cadena de PEG, cuando está presente, se selecciona del intervalo de 500 a 40.000 Daltons. Más particularmente, en algunas realizaciones, el segmento de péptido de clase 4 se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1313, SEQ ID NO: 1314, SEQ ID NO: 1315, SEQ ID NO: 1316, SEQ ID NO: 1346 y SEQ ID NO: 1347 en el que la cadena de PEG se selecciona del intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 5.000 Daltons, y más particularmente, en algunas realizaciones, la cadena de PEG es de aproximadamente 1.000 Daltons. En una realización adicional, el C-terminal está modificada para sustituir el grupo ácido carboxílico con un grupo amida.

[0612] El péptido de clase 4 puede comprender además uno o dos aminoácidos cargados añadió al extremo carboxi. En algunas otras realizaciones, en el que uno o dos aminoácidos cargados se añaden al extremo carboxi de la SEQ ID NO: 1344, los aminoácidos están cargados negativamente aminoácidos, incluyendo por ejemplo ácido glutámico y ácido aspártico. En algunas realizaciones, el péptido de Clase 4 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1342 en el que al menos una de las posiciones correspondientes 27 y 28 en relación con el péptido de glucagón natural comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido aspártico y ácido glutámico y en el que SEQ ID NO: 1342 se modifica opcionalmente para incluir una adición de uno a dos aminoácidos cargados negativamente añadido al extremo carboxi. En algunas realizaciones, los aminoácidos cargados negativamente son el ácido glutámico o ácido aspártico.

[0613] Los péptidos de clase 4 descritos en el presente documento se pueden combinar con otros agentes activos, incluyendo, por ejemplo, insulina, para tratar enfermedades o condiciones que se caracterizan por actividad de glucagón excesiva. En algunas realizaciones, los péptidos de la clase 4 que han sido modificados para ser unido covalentemente a una cadena de PEG que tiene un peso molecular mayor de 10.000 Daltons se pueden administrar en combinación con la insulina para ayudar a mantener los niveles de glucosa en la sangre estable en los diabéticos. La clase 4 péptidos de la presente divulgación se pueden administrar conjuntamente con la insulina como una sola composición, administrados simultáneamente como soluciones separadas, o alternativamente, la insulina y el péptido de Clase 4 se pueden administrar en diferentes momentos uno respecto al otro. En algunas realizaciones, la composición que comprende la insulina y la composición que comprende el péptido de Clase 4 se administran dentro de 12 horas uno del otro. La proparte exacta del péptido de clase 4 con relación a la insulina administrada dependerá en parte en la determinación de los niveles de glucagón del paciente, y puede determinarse mediante experimentación rutinaria.

Péptidos dímero

[0614] La presente descripción también abarca multímeros de la clase modificado 4 péptidos descritos en el presente documento. Dos o más de la Clase modificado 4 péptidos pueden ser unidos entre sí usando agentes y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica enlazan estándar. Por ejemplo, los dímeros se pueden formar entre dos modificados Clase 4 péptidos mediante el uso de agentes de reticulación bifuncionales tiol y reticulantes de amina bifuncionales, en particular para la clase de 4 péptidos que han sido sustituidos (en las posiciones 11, 16 o 19, por ejemplo) con cisteína, los residuos de ornitina lisina, homocisteína o acetilo fenilalanina (por ejemplo, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311 y SEQ ID NO: 1312). El dímero puede ser un homodímero o, alternativamente, puede ser un heterodímero. En algunas realizaciones se forma el dímero entre dos Clase 4 péptidos seleccionados independientemente entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1345, SEQ ID NO: 1346, o SEQ ID NO: 1347, en el que los dos péptidos están unidos entre sí a través de un enlazador unido a la posición 11 de cada péptido, 16 de cada péptido, o la posición 19 de cada péptido o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el enlace es un enlace disulfuro entre un Cys11 a Cys11 o Cys19 una a Cys19 o un resto Cys11 a Cys19 de los respectivos Clase 4 péptidos peptídicos.

[0615] Del mismo modo, un dímero puede estar formada entre dos Clase 4 péptidos péptido seleccionado independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1303, SEQ ID NO: 1304, SEQ ID NO: 1305, SEQ ID NO: 1306, SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1310, SEQ ID NO: 1311, SEQ ID NO: 1312, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1337, SEQ ID NO: 1338, SEQ ID NO: 1339 y SEQ ID NO: 1342 en el que se forma la conexión entre las posiciones de aminoácidos independientemente seleccionados de las posiciones 16, 21 y 24 con respecto al péptido de glucagón natural.

[0616] Según algunas otras realizaciones se proporciona un péptido dímero Clase 4 comprenden dos Clase 4 péptidos, comprendiendo cada uno la secuencia de SEQ ID NO: 1346, en el que los dos antagonistas están unidos entre sí por un enlace disulfuro a través de la posición de aminoácido 25. En otra realización se proporciona un dímero peptídico de clase 4 que comprende dos péptidos de clase 4, comprendiendo cada uno la secuencia de SEQ ID NO: 1347, en el que los dos antagonistas están unidos entre sí por un enlace disulfuro a través de la posición de aminoácido 35. En algunas realizaciones el dímero se forma a partir de los péptidos de la clase 4 de SEQ ID NO: 1346 y SEQ ID NO: 1347 ácido en el que el aminoácido en la posición 10 es glutámico.

[0617] En algunas realizaciones, el dímero comprende un homodímero de un péptido de fusión 4 péptido clase seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1336, SEQ ID NO: 1337, SEQ ID NO: 1340, SEQ ID NO: 1339, N°: 1340, SEQ ID NO: 1341, SEQ ID NO: 1342 y las sales farmacéuticamente aceptables de dichos Clase 4 péptidos. Según algunas otras realizaciones se proporciona un dímero que comprende una primer péptido de clase 4 unido a un segundo péptido de clase 4 a través de un enlazador, en el que el primer y segundo péptidos de la dímero se seleccionan independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1307, SEQ ID N°: 1308, SEQ ID N°: 1336, SEQ ID N°: 1337, SEQ ID N°: 1339, SEQ ID N°: 1340, SEQ ID N°: 1341, y SEQ ID NO: 1342, y sales farmacéuticamente aceptables de dichos polipéptidos de glucagón. En otra realización el primer y segundo péptidos de clase 4 del dímero se seleccionan independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1307, SEQ ID NO: 1308, SEQ ID NO: 1336 y SEQ ID NO: 1339.

[0618] En otra realización, el dímero comprende un homodímero de un péptido de clase 4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1323, SEQ ID NO: 1324, SEQ ID NO: 1325, SEQ ID NO: 1326, SEQ ID NO: 1327, SEQ ID NO: 1328, SEQ ID NO: 1329, SEQ ID NO: 1330, SEQ ID NO: 1331. En otra realización, un dímero de péptido de clase 4 se proporciona en el que el primer y segundo péptidos de la dímero comprenden un aminoácido secuencia selecciona independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1323, SEQ ID NO: 1324, SEQ ID NO: 1325, SEQ ID NO: 1326, SEQ ID NO: 1327 y SEQ ID NO: 1328. En otra realización, los comprende dímero un homodímero de un péptido de clase 4 seleccionado del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1309, SEQ ID NO: 1311 y SEQ ID NO: 1312, en el que el péptido comprende además una cadena de polietilenglicol unido covalentemente a la posición 11 o 19 de la glucagón péptido.

[0619] El péptido relacionado con glucagón 4 Clase puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1301-1371, opcionalmente con hasta 1, 2, 3, otras 4, o 5 modificaciones que retienen la actividad antagonista del glucagón.

Péptidos relacionados con glucagón de clase 5

[0620] En ciertas realizaciones, un péptido relacionado con glucagón es un péptido relacionado con glucagón de clase 5 (ver, por ejemplo, Solicitud de Patente internacional N° WO 2009/058734).

[0621] Todas las secuencias biológicas referencia en la sección siguiente (SEQ ID NOs: 1401-1518) corresponden a SEQ ID NOs.: 1-118 en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 2009/058734.

65 *Actividad*

[0622] En ciertos aspectos un péptido relacionado con glucagón de clase 5 (en lo sucesivo referido como una "péptido de clase 5") puede ser un agonista antagonista de glucagón/GLP-1. Los antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1 se utilizan en cualquier entorno en el que se desea la supresión de agonismo glucagón, mientras que también se desea la estimulación simultánea de la actividad de GLP-1. Por ejemplo, la actividad antagonista del glucagón en conjunción con GLP-1 estimulación se puede utilizar en el tratamiento de la diabetes, donde el antagonismo del glucagón se ha demostrado en modelos preclínicos de la hiperglucemia para producir un descenso de la glucosa en sangre y la actividad de GLP-1 está asociada con la insulina producción. Los compuestos que demuestran la actividad de GLP-1 también se han conocido por ser útil para el tratamiento de la obesidad y la prevención del aumento de peso.

[0623] En ciertos aspectos se cree péptidos de clase 5 para ser adecuado para cualquier uso que ha sido previamente descrito para otros antagonistas de glucagón/agonistas de GLP-1. Estas dos actividades por separado han demostrado ser propiedades altamente deseables para el tratamiento del síndrome metabólico, específicamente la diabetes y la obesidad. La actividad antagonista del glucagón es útil en cualquier entorno en el que se desea la supresión de agonismo glucagón. La presencia de agonismo de GLP-1 suprime aún más la secreción endógena de glucagón del páncreas, mientras que la estimulación de la síntesis y secreción de insulina. Las dos acciones farmacológicas sirven de una manera sinérgica para normalizar las alteraciones metabólicas. Por consiguiente, la péptidos de clase 5 se pueden utilizar para tratar la hiperglucemia, o tratar otras enfermedades metabólicas que resultan de niveles elevados de glucagón o los niveles altos de glucosa en sangre. Según algunas realizaciones, el paciente a ser tratado usando el antagonista de glucagón/agonista de GLP-1s tales como péptidos de clase 5 descritos en el presente documento es un animal domesticado, y en otra realización el paciente a ser tratado es un humano. Los estudios sugieren que la falta de supresión de glucagón en pacientes diabéticos contribuye a la hiperglucemia posprandial, en parte, a través de la glucogenólisis acelerada. El análisis de glucosa en la sangre durante una Prueba de Tolerancia a la Glucosa Oral (OGTT), y en presencia o ausencia de supresión de glucagón somatostatina inducida ha mostrado un aumento significativo en la glucosa en sujetos con los niveles de glucagón elevados. Según ello, un antagonista de glucagón/agonista de GLP-1s o Clase 5 péptidos descritos en el presente documento pueden utilizarse para tratar la hiperglucemia, y se espera que sean útiles para tratar una variedad de tipos de diabetes, incluyendo diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, o diabetes gestacional diabetes, ya sea dependiente de insulina o no dependiente de insulina, y la reducción de las complicaciones de la diabetes, incluyendo nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

[0624] Se espera que tales procedimientos para reducir el apetito o promover la pérdida de peso corporal para ser útil en la reducción de peso corporal, la prevención del aumento de peso, o tratar la obesidad de diversas causas, incluyendo la obesidad inducida por fármacos, y la reducción de las complicaciones asociadas con la obesidad, incluyendo la enfermedad vascular (enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, la reperfusión de la isquemia, etc.), hipertensión, aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas.

[0625] Las composiciones farmacéuticas que comprenden la péptidos de clase 5 se pueden formular y administrar a los pacientes que utilizan portadores y vías de administración conocidos por los expertos en la técnica aceptables pharmaceutically estándar. En consecuencia, la presente descripción también abarca composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos de clase 5 descritos en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas pueden comprender la péptidos de clase 5 como el único componente farmacéuticamente activo, o de la péptidos de clase 5 pueden ser combinados con uno o más agentes activos adicionales. Según algunas realizaciones, una composición se proporciona que comprende un péptido de clase 5 y la insulina o un análogo de insulina. Alternativamente, se proporciona una composición para inducir la pérdida de peso o prevenir el aumento de peso puede estar previsto que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1421 (GPSSGAPPPS) o SEQ ID NO: 1450 unido al aminoácido 24 de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451, y un péptido anti-obesidad. Los péptidos anti-obesidad adecuados incluyen los descritos en las patentes US 5,691,309, 6,436,435 o solicitud de patente de EE.UU. 20050176643.

Estructura de péptido de clase 5

[0626] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un péptido de Clase 5 que comprende un péptido de tipo glucagón que ha sido modificada por la delección de los primeros 1 a 5 residuos de aminoácidos (por ejemplo, primero de aminoácidos, dos primeros aminoácidos, los primeros tres aminoácidos, primeros cuatro aminoácidos, cinco primeros aminoácidos) de la N-terminal, y la estabilización de la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del compuesto (aproximadamente las posiciones de aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos de natural escriba glucagón, SEQ ID NO: 1401), por ejemplo, por la unión de las cadenas laterales de pares de aminoácidos, seleccionados de las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28 (en relación con el péptido de glucagón natural secuencia), entre sí a través de enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas, tales como la formación de puentes salinos, o por enlaces covalentes. Alternativamente, la estabilización de la hélice alfa alrededor residuos 12-29 se logra mediante la introducción de una o más aminoácido alfa, alfa disustituidos en las posiciones que retienen la actividad deseada. En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) del

5 péptido de Clase 5 o análogo del mismo está sustituido con un aminoácido alfa, alfa disustituido. Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) de un péptido de clase 5 o análogo del mismo con ácido amino iso-butírico (Aib) proporciona una hélice alfa estabilizado en ausencia de un puente salino o lactama. En algunas realizaciones, uno, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 o 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) están sustituidos con Aib.

10 **[0627]** Según algunas otras realizaciones, se proporciona un péptido de clase 5 en donde el péptido muestra al menos 80% de la agonismo máximo conseguido por GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, y muestra actividad antagonista de glucagón que reduce el máximo glucagón la producción de AMPc inducida en el receptor de glucagón en al menos aproximadamente 50%, medido por la producción de AMPc en un ensayo in vitro. En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 muestra al menos 90% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, y muestra actividad antagonista de glucagón, que reduce la producción máxima de AMPc inducida por glucagón en el receptor de glucagón por al menos aproximadamente el 80%.

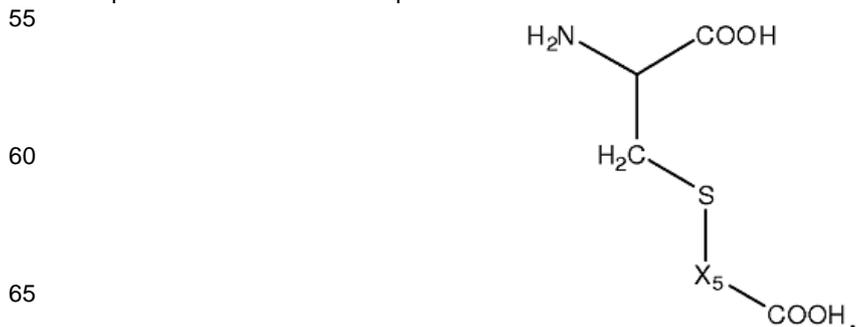
15 **[0628]** Según algunas realizaciones, el péptido de clase 5 comprende un péptido derivado de la SEQ ID NO: 1402 en el que el péptido comprende más sustituciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 1402 en una a tres posiciones de aminoácidos seleccionados de las posiciones 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22 y 24, y muestra al menos 90% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, y muestra actividad antagonista de glucagón, que reduce la producción máxima de AMPc inducida por glucagón en el receptor de glucagón en al menos aproximadamente 80%.

20 **[0629]** En algunas realizaciones, la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal del péptido de Clase 5 (aproximadamente los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) se estabiliza mediante, por ejemplo, formación de una covalente o puente intramolecular no covalente, o sustitución y/o inserción de aminoácidos en torno a las posiciones 12-29 con un ácido alfa hélice-estabilización de amino (por ejemplo, un alfa, alfa disustituida aminoácido). En algunas realizaciones, uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) del péptido de Clase 5 o análogo del mismo está sustituido con un alfa, alfa disustituida de aminoácidos, por ejemplo, amino ácido isobutírico (Aib). Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) de un péptido de clase 5 o análogo del mismo con ácido amino iso-butírico (Aib) proporciona una hélice alfa estabilizado en ausencia de un puente salino o lactama.

35 **[0630]** En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 comprende SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451, y más particularmente, una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, SEQ ID NO: 1408, SEQ ID NO: 1409, SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1418, SEQ ID NO: 1419, SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424 y SEQ ID NO: 1425. En otras otras realizaciones el péptido de clase 5 comprende un péptido derivado de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 en el que el péptido comprende un además aminoácido sustitución comparación con la SEQ ID NO: 1415 o SEQ ID NO: 1451 en una a tres posiciones de aminoácidos seleccionadas de las posiciones 1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14. En algunas realizaciones, las sustituciones en las posiciones 1, 2, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14 son sustituciones conservativas de aminoácidos. En algunas realizaciones, la treonina en la posición 24 de la SEQ ID NO: 1 405 o SEQ ID NO: 1 406 es sustituido por glicina.

45 **[0631]** Según algunas realizaciones, el péptido de clase 5 representa una modificación adicional de la péptido en el que además de la supresión N-terminal, la fenilalanina en la posición 6 del péptido de glucagón natural se modifica, por ejemplo, para comprender un grupo hidroxilo en lugar del grupo amino N-terminal. En una realización adicional el ácido carboxílico natural del aminoácido C-terminal se sustituye con un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster.

50 **[0632]** Según algunas realizaciones, péptidos de clase 5 se han preparado en el que se han eliminado los primeros tres a cinco aminoácidos del glucagón natural, el aminoácido en la posición 9, con respecto al péptido de tipo glucagón natural, se ha sustituido con un amino ácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido beta-homoglutámico, un derivado de ácido sulfónico de la cisteína, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄, o alquino C₂-C₄, y la estructura de hélice alfa en la parte C-terminal de glucagón (aproximadamente los aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) se estabiliza, por ejemplo, a través de una lactama puente está formado entre las cadenas laterales de los aminoácidos 12 y 16 o entre los aminoácidos 16 y 20, en relación con el péptido de glucagón natural. Ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que son capaces de unirse covalentemente para formar un puente que un átomo se detallan a través de salida de esta descripción. En algunas realizaciones, el derivado de ácido sulfónico de la cisteína es el ácido cisteico o ácido homocisteico.

[0633] En algunas realizaciones se proporciona un péptido de clase 5 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, o SEQ ID NO: 1408, en el que dicho péptido comprende un anillo de lactama formada entre las cadenas laterales de los aminoácidos 7 y 11 para la SEQ ID NO: 1405, entre 11 y 15 por SEQ ID NO: 1406, entre las posiciones 15 y 19 de SEQ ID NO: 1407 y entre las posiciones 19 y 24 para la SEQ ID NO: 1408, cada una de dichas secuencias que se modifican adicionalmente para comprender un resto hidrófilo unido covalentemente al péptido. Más particularmente, en algunas realizaciones cada uno de los péptidos de clase 5 con lactama es modificado por la unión covalente de una cadena de polietilenglicol. Por ejemplo, para un péptido de clase 5 que comprende la SEQ ID NO: 1405, el péptido se pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 12, 15, 16, 19 y 24; para un péptido de clase 5 que comprende la SEQ ID NO: 1406, el péptido se pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 12, 16, 19 y 24; para un péptido de clase 5 que comprende la SEQ ID NO: 1407, el péptido se pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 11, 12, 16 y 24; para la péptido de clase 5 que comprende la SEQ ID NO: 1408, el péptido se pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 11, 12, 15 y 16. Según algunas otras realizaciones un péptido de clase 5 que comprende la SEQ ID NO: 1447 o la SEQ ID NO: 1448 se proporciona en el que el péptido está pegilado en una posición seleccionada del grupo que consiste en 12, 16, 19 y 24, con relación a la SEQ ID NO: 1 447 o SEQ ID NO: 1448 secuencia. En una realización adicional, el péptido de SEQ ID NO: 1 447 o SEQ ID NO: 1 448 se modifica adicionalmente mediante la adición de la secuencia de SEQ ID NO: 1421 para el extremo carboxi terminal del péptido.

[0634] Tal como se detalla anteriormente en cierta clase aspectos están dentro de 5 péptidos en los que los primeros cinco aminoácidos del glucagón natural se han eliminado, el grupo amino del amino N-terminal de ácido (fenilalanina) ha sido sustituido con un grupo hidroxilo (es decir, el primer aminoácido es fenilo-ácido láctico) y las cadenas laterales de uno o más pares de aminoácidos seleccionadas de las posiciones 12 y 16, 16 y 20, 20 y 24, y 24 y 28 están unidos entre sí, estabilizando así la Clase 5 péptido de la hélice alfa.

[0635] Según algunas otras realizaciones se proporciona un péptido de clase 5, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1402 que es modificado por una sustitución del residuo serina en la posición 11 de la SEQ ID NO: 1402 (posición 16 según el aminoácido numeración de glucagón natural) con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, treonina o glicina. Según algunas realizaciones, el residuo de serina en la posición 11 de la SEQ ID NO: 1 402 se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, y, en algunas realizaciones, el residuo de serina está sustituido con ácido glutámico. Según algunas realizaciones, el péptido de clase 5 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1438.

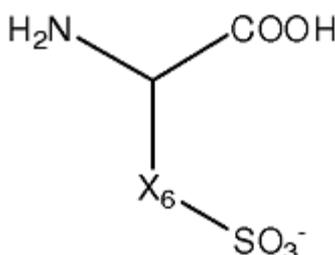
[0636] En algunas realizaciones se proporciona un 5 péptido de clase en el que un puente intramolecular se forma entre dos cadenas laterales de aminoácidos para estabilizar la estructura tridimensional de la terminal carboxi del péptido de la SEQ ID NO: 1402. Más particularmente, las cadenas laterales de uno o más aminoácidos seleccionados de los pares de aminoácidos 7 y 11, 11 y 15, 15 y 19 o 19 y 23 de la SEQ ID NO: 1 402 están unidos entre sí, estabilizando así la hélice alfa en la parte C-terminal. Las dos cadenas laterales pueden estar unidos entre sí a través de enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas (tales como la formación de puentes salinos), o por enlaces covalentes. Según algunas realizaciones, el tamaño del enlazador es de 7-9 átomos, y en algunas realizaciones el tamaño del enlazador es de 8 átomos. En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 se selecciona entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407 y SEQ ID NO: 1408. En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal del péptido de clase 5 tiene un grupo amida sustituyendo el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural.

[0637] Según algunas realizaciones se proporciona péptido de clase 5 en el que el análogo comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1409. En algunas realizaciones, el de la estructura tridimensional del extremo carboxilo terminal del péptido de la SEQ ID NO: 1409 es estabilizado por la formación de enlaces covalentes entre las cadenas laterales del péptido. En algunas realizaciones dos cadenas laterales de aminoácidos están unidos entre sí para formar un anillo de lactama. El tamaño del anillo de lactama puede variar dependiendo de la longitud de las cadenas laterales de aminoácidos, y en algunas realizaciones la lactama está formada mediante la unión de las cadenas laterales de un aminoácido lisina a una cadena lateral de ácido glutámico. En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal de los péptidos de clase 5 tienen un grupo amida sustituyendo el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural.

[0638] El orden del enlace amida en el anillo de lactama se puede invertir (por ejemplo, un anillo de lactama se

pueden formar entre las cadenas laterales de un Lys 12 y una Glu16 o alternativamente entre una Glu 12 y una Lys16). Según algunas realizaciones un análogo de glucagón de la SEQ ID NO: se proporciona 1.409 en el que al menos un anillo de lactama está formada entre las cadenas laterales de un par de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de pares de aminoácidos 7 y 11, 11 y 15, 15 y 19 o 19 y 23 de la SEQ ID NO: 1409. En algunas realizaciones se proporciona un 5 péptido de clase en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1410, dicha secuencia que comprende además un puente de lactama intramolecular formado entre las posiciones de aminoácidos 7 y 11, o entre las posiciones de aminoácidos 11 y 15, o entre las posiciones de aminoácidos 15 y 19 de la SEQ ID NO: 1410. En algunas realizaciones se proporciona un 5 péptido de clase en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1411, dicho secuencia que comprende además un puente de lactama intramolecular formado entre las posiciones de aminoácidos 7 y 11, o entre las posiciones de aminoácidos 11 y 15 de la SEQ ID NO: 1411. En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1417.

[0639] Adicional péptido de clase 5 se proporcionan comprende derivados de SEQ ID NO: 1405, en el que el ácido aspártico en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1405 (posición 15 del glucagón natural) ha sido sustituido con ácido glutámico, un aminoácido de la estructura general:



en la que X₆ es alquilo C₁-C₃, alqueno C₂-C₃ o alquinilo C₂-C₃, y en algunas realizaciones X₆ es alquilo C₁-C₃, y en otra realización X₆ es alquilo C₂. En algunas realizaciones un derivado péptido de Clase 5 de la SEQ ID NO: se proporciona 1409 la que la posición 10 de la SEQ ID NO: 1409 (posición 15 del glucagón natural) se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico y ácido homoglutámico. En una posición realización adicional 10 de la SEQ ID NO: 1 409 se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico o ácido homocisteico. En algunas realizaciones un derivado péptido de Clase 5 de la SEQ ID NO: se proporciona 1408 la que la posición 10 de la SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID N° 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID NO: 1408 es sustituido con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico y ácido homoglutámico. En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal de un péptido de clase 5 tiene un grupo amida sustituyendo el grupo ácido carboxílico que está presente en el aminoácido natural.

[0640] En algunas realizaciones un aminoácido de la péptido de clase 5 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, incluyendo, por ejemplo, maleimido, sulfona de vinilo, 2- piridiltio, haloalquilo, y haloacilo. Estos reactivos reactivos tiol pueden contener carboxi, ceto, hidroxilo y grupos éter, así como otros restos hidrófilos tales como unidades de polietilenglicol. En una realización alternativa, un aminoácido de un péptido de clase 5 se sustituye con lisina, y la cadena lateral del residuo de lisina sustituyendo se modifica adicionalmente utilizando amina reactivos reactivos, tales como ésteres activos (succinimido, anhídrido, etc.) de ácidos carboxílicos o aldehídos de restos hidrófilos tales como polietilenglicol. Según algunas realizaciones, el residuo de lisina correspondiente a la posición 7 del péptido de la SEQ ID NO: 1405 está sustituido con arginina y una única sustitución de lisina se inserta para uno de los aminoácidos correspondiente a la posición 12, 15, 16, 19 y 24 de SEQ ID NO: 1405.

[0641] En otra realización, el residuo de metionina correspondiente a la posición 22 de la péptidos de clase 5 descritos en el presente documento se cambia a leucina o norleucina para evitar la degradación oxidativa del péptido.

[0642] Por otra parte péptidos de clase 5, en algunos aspectos, también abarcan sustituciones de aminoácidos en las posiciones que se sabe que no ser crítica para la función del análogo de glucagón. En algunas realizaciones las sustituciones son sustituciones de aminoácidos conservativas en uno, dos o tres posiciones seleccionadas del grupo que consiste de 2, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 22, 23 o 24. en algunas realizaciones, los aminoácidos correspondientes a las posiciones 16, 17, 20, 21, 24 o 29 del péptido glucagón natural, y más particularmente en la posición 21 y/o 24 con respecto al glucagón natural están sustituidos con cisteína o lisina, en el que una cadena de PEG está unida covalentemente a la cisteína sustituida o residuo de lisina.

[0643] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un péptido de clase 5 que comprende una secuencia que consiste en SEQ ID NO: 1409, modificar adicionalmente por una o más sustituciones adicionales de aminoácidos en

posiciones correspondientes a las posiciones 11, 12, 15, 16, 19 y/o 24 del péptido (incluyendo por ejemplo la sustitución con cisteína), en el que la sustitución de aminoácidos comprende un aminoácido que tiene una cadena lateral adecuada para la reticulación con restos hidrófilos, incluyendo por ejemplo, PEG. El glucagón natural puede estar sustituido con un aminoácido de origen natural o sintético (de origen no natural) de aminoácidos. Sintético o de origen no natural aminoácidos se refieren a aminoácidos que no ocurren de forma natural *in vivo* pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas aquí. En algunas realizaciones se proporciona un péptido de clase 5 en el que el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1409 y comprende además una cadena de polietilenglicol unido a la posición 16 o 19 del péptido. En una realización adicional, el extremo C-terminal del análogo de glucagón se modifica para reemplazar el grupo ácido carboxílico con un grupo amida.

[0644] Según algunas otras realizaciones, se proporciona un péptido de clase 5, que comprende un análogo de glucagón seleccionado del grupo que consiste en:

R₁-Phe- Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Xaa-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-
Gln-Trp-Leu-Xaa-Asn- Thr-R₂ (SEQ ID NO: 1439)

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-
Gln-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 1413),

R₁-Phe-Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Asp-Phe-Val-Xaa-Trp-Leu-Xaa-Asn-Thr-R₂
(SEQ ID NO: 1414) y

R₁-Phe- Thr-Ser-Xaa-Tyr-Ser-Lys-Tyr-Leu-Asp-Glu-Arg-Arg-Ala-Gln-Xaa-Phe-Val-
Xaa-Trp-Leu- Xaa-Asn-Thr-R₂ (SEQ ID NO: 1412),

en la que Xaa en la posición 4 = ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o el ácido homocisteico, Xaa en la posición 10 = Asp, Glu, ácido cisteico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, Xaa en la posición 16 es Asp, Cys, Orn, homocisteína o acetilo fenilalanina y el Xaa en la posición 19 es Gln, Cys, Orn, la homocisteína y la fenilalanina acetilo, Xaa en la posición 22 = Met, Leu o Nle, R₁ es OH o NH₂, y R₂ es Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser Xaa (SEQ ID NO: 1450; en la que Xaa es Cys, Orn, homocisteína o acetilo fenilalanina), COOH o CONH 2, en el que el péptido se pegilado opcionalmente en la posición 16 de la SEQ ID NO: 1413, posición 19 de la SEQ ID NO: 1414 y en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 1412. En algunas realizaciones, la Thr en la posición 24 de SEQ ID NOs: 1412-1414 y 1439 está sustituido con Gly. Según algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 1414, en el que R₁ es OH. Según algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1413 o SEQ ID NO: 1414, en el que R₁ es OH y R₂ es CONH 2. De conformidad con algunas realizaciones, el péptido comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1413 o SEQ ID NO: 1414, en el que R₁ es OH, R₂ es CONH 2 y la treonina en la posición 24 está sustituido con glicina.

[0645] En algunas realizaciones, un péptido de clase 5 se modifica además para comprender uno o más aminoácidos de GLP-1 natural por sustitución del residuo de glucagón natural (s) en las posiciones de aminoácidos correspondientes. Por ejemplo, el péptido de clase 5 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos en cualquiera de las posiciones 2, 3, 17, 18, 21, 23, y 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón natural). En una realización específica, el péptido de clase 5 es modificada por una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: Ser₂ se sustituye con Ala, Gln₃ se sustituye con Glu, Arg₁₇ se sustituye con Gln, Arg en la posición 18 se sustituye con Ala, Asp en la posición 21 se sustituye con Glu, Val en la posición 23 se sustituye con Ile y Gln en la posición 24 se sustituye con Ala (posiciones de los aminoácidos están según la secuencia de glucagón natural). En una realización específica, el péptido de clase 5 se modifica mediante la sustitución de Ser₂ con Ala y Gln₃ con Glu (según la numeración de aminoácidos del glucagón natural). En otra realización específica, el péptido de clase 5 se modifica con todas las siguientes sustituciones de aminoácidos: Arg₁₇ se sustituye con Gln, Arg en la posición 18 se sustituye con Ala, Asp en la posición 21 se sustituye con Glu, Val en la posición 23 se sustituye con Ile y Gln en la posición 24 se sustituye con Ala (numeración de aminoácidos según el glucagón

natural). En aún otra realización específica, el péptido de clase 5 se modifica para comprender simplemente Glu en la posición 21 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401). En consecuencia, el péptido de clase 5 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1460-1470, 1473-1478, 1480-1488, 1490-1496, 1503, 1504, 1506, y 1514 a 1518.

[0646] También se proporciona en el presente documento es un péptido de clase 5 o conjugado del mismo que comprende (1) una hélice alfa estabilizada a través de medios descritos en el presente documento (por ejemplo, a través de un puente intramolecular, o la incorporación de una o más alfa, aminoácidos alfa-di-sustituido, o un aminoácido ácido en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401), o una combinación de los mismos; (2) una amida C-terminal o éster en lugar de un carboxilato C-terminal, y (3) una estructura general de ABC,

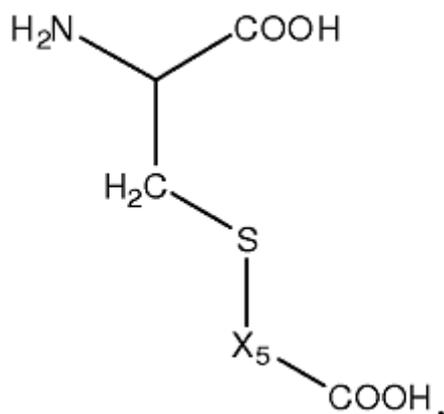
en el que a se selecciona entre el grupo que consiste en

(i) ácido fenil láctico (PLA);

(ii) un derivado de oxi de PLA; y

(iii) un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos amino consecutivo ácidos del péptido están unidos a través de un enlace éster o éter, en el que B representa aminoácidos p a 26 de la SEQ ID NO: 1401, en el que p es 3, 4, 5, 6, o 7, que comprende opcionalmente uno o más modificaciones de aminoácidos, como se describe en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las modificaciones descritas para la péptidos de clase 5. por ejemplo, el uno o más modificación puede seleccionarse del grupo constituido por:

(iv) Asp en la posición 9 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401) está sustituido con un Glu, un derivado de ácido sulfónico de Cys, ácido homoglutámico, ácido beta-homoglutámico, o un derivado alquilcarboxilato de cisteína que tiene la estructura de:



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄;

(v) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 10, 20 y 24, (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401) con un aminoácido unido covalentemente a un grupo acilo o alquilo a través de un éster, éter, tioéter, amida, o alquilo amina unión;

(vi) sustitución de uno o dos aminoácidos en las posiciones 16, 17, 20, 21, y 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401) con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: Cys, Lys, ornitina, homocisteína, y acetyl-fenilalanina (Ac-Phe), en donde el aminoácido del grupo está unido covalentemente a un resto hidrófilo;

(vii) Asp en la posición 15 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401) está sustituido con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(viii) Ser en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401) está sustituido con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;

(ix) Arg en la posición 17 se sustituye con Gln, Arg en la posición 18 se sustituye con Ala, Asp en la posición 21 se sustituye con Glu, Val en la posición 23 se sustituye con Ile y Gln en la posición 24 se sustituye con Ala (de acuerdo a amino de numeración de ácido de SEQ ID NO: 1401);

(x) Ser en la posición 16 se sustituye con Glu, Gln en la posición 20 se sustituye con Glu, o Gln en la posición 24 se sustituye con Glu (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401); en la que C (de la estructura general de ABC) se selecciona del grupo que consiste en:

(vii) X;

(viii) X-Y;

(ix) X-Y-Z;

(x) X-Y-Z-R10; en la que X es Met, Leu, Nle o; Y es Asn o un aminoácido cargado; Z es Thr, Gly, Cys, Lys, ornitina (Orn), homocisteína, fenilalanina acetilo (Ac-Phe), o un aminoácido cargado; en el que R10 se selecciona de un grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1421, 1426, 1427, y 1450.

5 **[0647]** En un aspecto específico, el péptido comprende un derivado de oxi de PLA. Tal como se usa en el presente documento "oxi-derivado de PLA" se refiere a un compuesto que comprende una estructura modificada de PLA en la que el grupo hidroxilo ha sido sustituido con OR 11, en el que R11 es un resto químico. A este respecto, el derivado de oxi de PLA puede ser, por ejemplo, un éster de PLA o un éter de PLA.

10 **[0648]** Los procedimientos para preparar derivados oxi de PLA son conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el derivado de oxi es un éster de PLA, el éster puede formarse por tras la reacción del hidroxilo de PLA con un carbonilo que lleva un nucleófilo. El nucleófilo puede ser cualquier nucleófilo adecuado, incluyendo, pero no limitado a una amina o hidroxilo. En consecuencia, el éster de PLA puede comprender la estructura de Fórmula IV:

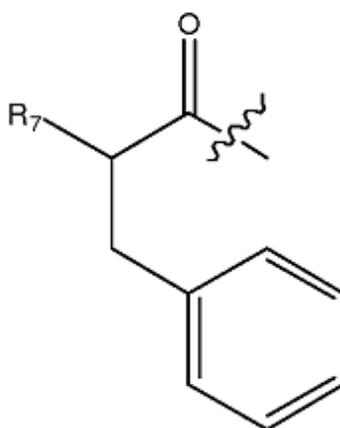
15

20

25

30

35



Fórmula IV

40 en la que R₇ es un éster formado por reacción del hidroxilo de PLA con un carbonilo que lleva un nucleófilo.

40

[0649] El carbonilo que lleva un nucleófilo (que reacciona con el hidroxilo de PLA para formar un éster) puede ser, por ejemplo, un ácido carboxílico, un derivado de ácido carboxílico, o un éster activado de un ácido carboxílico. El derivado de ácido carboxílico puede ser un cloruro de acilo, un anhídrido de ácido, una amida, un éster, o un nitrilo. El éster activado de un ácido carboxílico puede ser, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), tosilato (Tos), una carbodiimida, o un hexafluorofosfato. En algunas realizaciones, la carbodiimida es 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), o 1,3-diisopropilcarbodiimida (DICD). En algunas realizaciones, el hexafluorofosfato se selecciona de un grupo que consiste en hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris (dimetilamino) fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il) -1,1,3,3-tetrametil uronio (HATU), y hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N, N, N', N'-tetrametil-uronio (HBTU).

50

[0650] Los procedimientos para preparar éteres a partir de la reacción con un grupo hidroxilo (por ejemplo, el hidroxilo de PLA) son también conocidos en la técnica. Por ejemplo, el grupo hidroxilo de PLA puede hacerse reaccionar con un alquilo halogenado o tosilado alcohol de alquilo para formar un enlace éter.

55

[0651] En una realización específica, el resto químico unido a PLA través de un enlace que contiene oxígeno (por ejemplo, a través de un enlace éster o éter) es un polímero (por ejemplo, un polialquilenglicol), un carbohidrato, un aminoácido, un péptido, o un lípido, por ejemplo, un ácido graso o un esteroide.

60

[0652] En una realización específica, el resto químico es un aminoácido, que, opcionalmente, es una parte de un péptido, de manera que la Fórmula IV es un depsipéptido. En este sentido, PLA puede estar a una posición distinta de la de residuos de aminoácidos N-terminal del péptido, de manera que el péptido comprende uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, o más) amino ácidos N-terminal al residuo PLA. Por ejemplo, el péptido puede comprender PLA en la posición n, donde n es 2, 3, 4, 5, o 6 del péptido.

65

[0653] Los aminoácidos N-terminales al residuo PLA pueden ser sintéticos o de origen natural. En una realización

específica, los aminoácidos que son N-terminal PLA son de origen natural aminoácidos. En algunas realizaciones, los aminoácidos que son N-terminal a PLA son los aminoácidos N-terminales de glucagón natural. Por ejemplo, el péptido puede comprender en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1452-56, en el que PLA está unida a treonina mediante un enlace éster:

- SEQ ID NO: 1452 Su-Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1453 Ser-Gln-Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1454 Gln-Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO : 1455 Gly-Thr-PLA
- SEQ ID NO: 1456 Thr-PLA

[0654] En una realización alternativa, uno o más de los aminoácidos N-terminales pueden estar sustituidos con un aminoácido distinto del de aminoácidos del glucagón natural. Por ejemplo, cuando el péptido comprende PLA como el aminoácido en la posición 5 o 6, el aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 1 del péptido es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), N-metil histidina, histidina alfa-metil, acético imidazol ácido, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido antagonista/agonista es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, alanina N-metilo, y aminoácidoisobutírico (Aib). También, por ejemplo, cuando el péptido comprende PLA como el aminoácido en la posición 4, 5, o 6, el aminoácido en la posición 3 del péptido puede ser ácido glutámico, en contraposición al residuo glutamina natural de glucagón natural. En una realización de ejemplo de la invención, el péptido comprende en el extremo N-terminal la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1457-1459.

[0655] Con respecto a los péptidos que comprenden un compuesto de Fórmula IV, el polímero puede ser cualquier polímero, siempre que pueda reaccionar con el grupo hidroxilo de PLA. El polímero puede ser uno que de forma natural o comprende normalmente un carbonilo que lleva un nucleófilo. Alternativamente, el polímero puede ser uno que se derivatizó a comprender el carbonilo que lleva el carbonilo. El polímero puede ser un polímero derivatizado de cualquiera de: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros de polivinilo, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo) y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y copolímeros de los mismos, celulosas incluyendo celulosa alquilo, hidroxialquilo celulosas, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, celulosas nitro, metil celulosa, etil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxipropil metil cellulose, celulosa hidroxibutilo metilo, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato de acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, celulosa carboxietil, triacetato de celulosa, y sal de sodio de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno), y poli(tereftalato de etileno), y poliestireno.

[0656] El polímero puede ser un polímero biodegradable, que incluye un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto-ésteres), poliuretanos, poli(ácido Butic), poli(ácido valérico), y poli(lactida-cocaprolactone)), y un polímero biodegradable natural (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones de rutina hechas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilos (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrófobas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea por hidrólisis enzimática o la exposición al agua *in vivo*, por erosión superficial o en masa.

[0657] El polímero puede ser un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por HS Sawhney, CP Pathak y JA Hubbell en *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587, los ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutin, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(lauril metacrilato), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo).

[0658] En algunas realizaciones, el polímero es un polímero soluble en agua. polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropil metilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, etilcelulosa hidroxipropilo, butylcellulose hidroxipropilo, pentylcellulose hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa (Ethocel), celulosa de hidroxietilo, varios alquilo Celulosas y celulosas de hidroxialquilo, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetil celulosa, carboximetil celulosa de sodio, carboximetil celulosa de calcio, acetato de vinilo/copolímeros de ácido crotonico, metacrilato de poli-hidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido polimetacrílico, polimetilmetacrilato, copolímeros de vinil éter/anhídrido maleico de metilo, alcohol de polivinilo, ácido

poliacrílico de sodio y de calcio, ácido poliacrílico, polímeros de carboxi ácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxietileno polioxipropileno, polymethylvinylether co-maleico anhidro paseo, carboximetilamida, potasio metacrilato de divinilbenceno co-polímero, polioxietilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos.

5 **[0659]** En una realización específica, el polímero es un glicol de polialquileno, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

10 **[0660]** El hidrato de carbono puede ser cualquier hidrato de carbono a condición de que comprende o está hecho para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. El hidrato de carbono, por ejemplo, puede ser uno que ha sido derivado para comprender un carbonilo con un grupo saliente alfa. En este sentido, el hidrato de carbono puede ser una forma derivatizada de un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, la rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (a almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidan, galactomanano.

15 **[0661]** El lípido puede ser cualquier lípido que comprende un carbonilo con un grupo saliente alfa. El lípido, por ejemplo, puede ser uno que se derivatiza a comprender el carbonilo. En este sentido, el lípido, puede ser un derivado de un ácido graso (por ejemplo, un ácido graso C₄-C₃₀, eicosanoides, prostaglandinas, leucotrienos, tromboxano, etanolamina N-acilo), glicerolípido (por ejemplo, mono-, di-, tri gliceroles sustituidas), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípidos (por ejemplo, la esfingosina, ceramida), esteroles de lípidos (por ejemplo, esteroides, colesterol), lípidos prenol, saccharolípido, o un policétido. En algunas realizaciones, el lípido es un aceite, cera, colesterol, esteroides, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, o un fosfolípido.

25 **[0662]** En algunas realizaciones, R 7 tiene un peso molecular de aproximadamente 100 kDa o menos, por ejemplo, aproximadamente 90 kDa o menos, aproximadamente 80 kDa o menos, aproximadamente 70 kDa o menos, aproximadamente 60 kDa o menos, aproximadamente 50 kDa o menos, aproximadamente 40 kDa o menos. Según ello, R7 puede tener un peso molecular de aproximadamente 35 kDa o menos, aproximadamente 30 kDa o menos, aproximadamente 25 kDa o menos, aproximadamente 20 kDa o menos, aproximadamente 15 kDa o menos, aproximadamente 10 kDa o menos, aproximadamente 5 kDa o menos, o aproximadamente 1 kDa.

30 **[0663]** En una realización alternativa, el péptido que comprende la estructura general de ABC comprende, como A, un péptido de 2 a 6 aminoácidos en el que dos aminoácidos consecutivos del péptido de A están unidos a través de un enlace éster o éter. El enlace éster o éter puede ser, por ejemplo, entre los aminoácidos 2 y 3, 3 y 4, 4 y 5, o 5 y 6. Opcionalmente, el péptido de A se puede modificar adicionalmente por enlace covalente a otro resto químico que incluye la unión a una polímero (por ejemplo un polímero hidrófilo), alquilación, o acilación.

35 **[0664]** En una realización específica, la péptido de clase 5 descrito anteriormente que comprende PLA se modifica para comprender un oxi-derivado de PLA, tal como, por ejemplo, un éster de PLA o un éter de PLA. Por ejemplo, el péptido de clase 5 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1402, 1405-1420, 1422-1425, 1432-1436, 1438, 1439, 1445, 1446, y 1451, en el que el PLA está unido a través de un enlace éster o éter a un aminoácido, péptido, polímero, grupo acilo, o un grupo alquilo. El, péptido, polímero, grupo acilo, o un grupo alquilo de aminoácidos pueden ser cualquiera de los descritos en el presente documento. En el caso de que el PLA se une mediante un enlace éster a un aminoácido o péptido, el péptido de clase 5 puede ser considerada como un depsipéptido.

40 **[0665]** Además, en otra realización específica, el péptido de clase descrita anteriormente 5 que carece de PLA se modifica para comprender al menos un enlace éster o un enlace éter entre dos aminoácidos consecutivos que son N-terminal para el aminoácido en la posición 7 (según la numeración de glucagón natural). En una realización específica, el péptido de clase 5 comprende al menos un enlace éster o éter entre los dos aminoácidos consecutivos. En una realización más específica, el péptido de Clase 5 comprende los N-terminales 6 aminoácidos de SEQ ID NO: 1401 y dos aminoácidos consecutivos de los N-terminales 6 aminoácidos están unidos a través de un enlace éster o éter.

45 **[0666]** El péptido de A puede comprender cualquiera de los aminoácidos, sintéticas o de origen natural, siempre que al menos dos aminoácidos consecutivos están unidos a través de un enlace éster o éter. En una realización específica, el péptido de A comprende los aminoácidos del glucagón natural. El aminoácido en la posición 1 y/o la posición 2 puede ser un aminoácido que reduce la susceptibilidad a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV. Por ejemplo, el péptido de A puede comprender en la posición 1 un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), N-metil histidina, histidina alfa-metilo, ácido acético imidazol, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina. Más particularmente, en algunas realizaciones, la posición 2 del péptido de A es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, alanina N-metilo, y aminoácidoisobutírico (AIB). También, por ejemplo, el aminoácido en la posición 3 del péptido de A puede ser el ácido glutámico, en contraposición al residuo glutamina natural de glucagón natural. En consecuencia, el péptido de estructura general de ABC puede comprender una secuencia de aminoácidos de:

Xaa1-Xaa2-Xaa3-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 1507);
 Xaa2-Xaa3-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 1508); o
 Xaa3-Thr-Gly-Phe (SEQ ID NO: 1509);

5 en la que Xaa1 se selecciona de un grupo que consiste en: His, D-histidina, alfa, ácido acético imidazole alfa-dimetil (DMIA), N-metil histidina, histidina alfa-metilo, ácido acético imidazol, desaminohistidine, hidroxilo-histidina, acetil-histidina y homo-histidina; Xaa2 se selecciona de un grupo que consiste en: Ser, D-serina, D-alanina, valina, glicina, serina N-metilo, alanina N-metilo, y aminoácidoisobutírico (Aib); y Xaa3 es Gln o Glu.

10 **[0667]** En algunas realizaciones, B es modificado por hasta tres modificaciones de aminoácidos. Por ejemplo, B, que representa la secuencia de aminoácidos natural de la SEQ ID NO: 1 401 es modificado por una o más modificaciones de aminoácidos conservativas.

15 **[0668]** En otra realización, B comprende una o más modificaciones de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en (iv) a (x), como se describe en el presente documento. En una realización específica, B comprende una o ambas de las modificaciones de aminoácidos (V) y (VI). En una realización específica adicional, B comprende uno o una combinación de modificaciones de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (iv), (vii), (viii), (ix) y (x), además de (v) y (vi).

20 **[0669]** Como se describe en el presente documento, el péptido que comprende la estructura general ABC puede comprender uno o más aminoácidos cargados en el extremo C-terminal, por ejemplo, como Y y/o Z, tal como se describe en el presente documento. Alternativamente o adicionalmente, el péptido que comprende la estructura general ABC puede comprender además uno y cincuenta y nueve aminoácidos cargados C-terminal a la Z, cuando C comprende X-YZ. Los aminoácidos cargados pueden ser, por ejemplo, uno de Lys, Arg, His, Asp, y Glu. En una realización específica, Y es Asp.

25 **[0670]** En algunas realizaciones, el péptido que comprende la estructura general ABC comprende un resto hidrófilo unido covalentemente a un residuo de aminoácido en la posición 1, 16, 20, 21, o 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401), o en el residuo N- o C-terminal del péptido que comprende el ABC estructura general. En una realización específica, el resto hidrófilo está unido a un residuo de Cys del péptido que comprende el ABC estructura general. En este sentido, el aminoácido en la posición 16, 21, 24, o 29 de glucagón natural (SEQ ID NO: 1401) pueden estar sustituidos con un residuo Cys. Alternativamente, un residuo de Cys que comprende un resto hidrófilo puede ser añadido a la C-terminal del péptido que comprende la estructura general ABC como la posición 30 o como la posición 40, por ejemplo, cuando el péptido que comprende la estructura general ABC comprende una extensión C-terminal (posiciones según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 30 35 1401). Alternativamente, el resto hidrófilo puede estar unido a la PLA del péptido que comprende la estructura general ABC a través del resto hidroxilo de PLA. El resto hidrófilo puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol.

40 **[0671]** En un aspecto específico, el péptido que comprende la estructura general ABC comprende una hélice alfa estabilizado en virtud de la incorporación de un puente intramolecular. En algunas realizaciones, el puente intramolecular es un puente de lactama. El puente de lactama puede estar entre los aminoácidos en las posiciones 9 y 12, los aminoácidos en las posiciones 12 y 16, los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, los aminoácidos en las posiciones 20 y 24, o los aminoácidos en las posiciones 24 y 28 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401). En una realización específica, los aminoácidos en las posiciones 12 y 16 o en las posiciones 16 y 20 45 (según la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1401) están unidos a través de un puente de lactama. Se contemplan otras posiciones del puente de lactama.

50 **[0672]** Adicionalmente o alternativamente, el péptido que comprende la estructura general ABC puede comprender un alfa, alfa aminoácido di-sustituido en, por ejemplo, cualquiera de las posiciones 16, 20, 21, o 24 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401). En algunas realizaciones, el ácido alfa, amino sustituido-di alfa es Aib. En un aspecto específico, la Aib se encuentra en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401).

55 **[0673]** Alternativamente o adicionalmente, el péptido que comprende la estructura general ABC se puede modificar para comprender un aminoácido ácido en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401), que la modificación mejora la estabilidad de la hélice alfa. El aminoácido ácido, en algunas realizaciones, es un aminoácido que comprende un ácido sulfónico de la cadena lateral o un ácido carboxílico de cadena lateral. En una realización más específica, el aminoácido ácido se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, ácido homoglutámico, un derivado de ácido sulfónico de Cys, ácido cisteico, ácido homocisteico, Asp, y un derivado alquilado de Cys que 60 tiene la estructura de

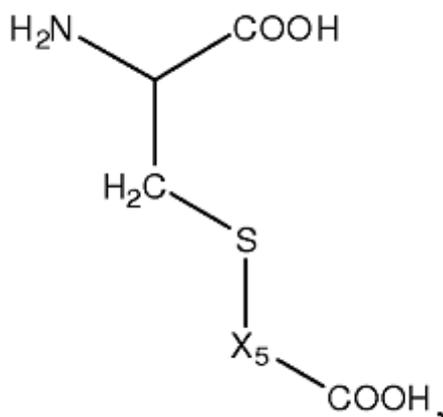
65

5

10

15

20



en la que X₅ es alquilo C₁-C₄, alqueno C₂-C₄ o alquino C₂-C₄.

25

[0674] En una realización específica, el péptido de clase 5 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1460-1470, 1473-1478, 1480-1488, 1490-1496, 1503, 1504, 1506, y 1514 1518, o que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos 2-6 de la tabla 13, los péptidos 1-8 de la tabla 14, y los péptidos 2-6, 8, y 9 de la tabla 15.

30

Tabla 13: Péptidos de glucagón Cex con lactama (6-39) y actividad antagonista de glucagón y agonista de GLP-1

			GLP-1 EC ₅₀ (nM)	Glu IC ₅₀ (nM)
1	E9, K12, E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (lactama)	63	2008
3	E9, E16K20	FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (lactama)	36	42
4	D9, K12E16	FTSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS (lactama)	118,7	828
5	[PLA6, E9, K12E16 (lactama)]	PLA-TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, E16K20 (lactama)]	PLA-TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20

35

Tabla 14: Péptidos de glucagón con lactama (1-29, 2 -29, 4-29 y 6-29) y su actividad antagonista de glucagón y agonista de GLP-1

(PA = antagonista parcial)			
		GLP-1 EC ₅₀ (nM)	Glucagón IC ₅₀ (nM)
	Glucagón HSQGTFTSDYSKYLSRRAQDFVQWLMNT		0,2 ~ 1,0*
	GLP-1 (aa 1-30) HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAW1VKGR	0,02 ~ 0,1	
1	[PLA6, D9, E16K20 (lactama), D28] G (6-29) PLA TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMNT	5 ~ 25	10 ~ 30
2	[PLA6, D9, K12E16 (lactama), D28] G (6-29) PLA TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMNT	177	63
3	[PLA6, D9, E16, K20E24 (lactama), D28] G (6-29) PLA TSDYSKYLDERRAKDFVEWLMNT	239	74
4	[PLA6, D9, E16, E24K28 (lactama)] G (6 ~ 29) PLA TSDYSKYLDERRAQDFVEWLMKT	289	22

5	[E9, E16K20 (lactama), D28] G(4 ~ 29) GTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	151	10 ~ 30
6	[E9, E16K20 (lactama), D28] G(2 ~ 29) SQGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	203	49 (PA)
7	[A2E3, E16K20 (lactama), D28] G(2 ~ 29) AEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	175	63
8	[A2E3, E16K20 (lactama), D28] G(1 ~ 29) HAEGTFTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	0,2	130 (PA)
9	ANK2 (péptido Bayer) HSQGTFTSDY ARYLDARRAREFIKWL VRGRG	0,28	agonista

*EC₅₀ en el receptor de glucagón

Tabla 15: Perfil de agonista/antagonista mixto

Análogos de glucagón (6-CEX)				
1	E9, K12, E16	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	1451	762
2	E9, K12E16 (lactama)	FTSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	63	2008
3	E9, E16K20 (lactama)	FTSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	36	42
4	D9, K12E20 (lactama)	FTSDYSKYLDERRAQDFVQWL1MNTGPSSGAPPPS	18	828
5	[PLA6, E9, K12E20 (lactama)]	PLA TSEYSKYLDERRAQDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	6	72
6	[PLA6, E9, E16K20 (lactama)]	PLA- TSEYSKYLDERRAKDFVQWLMNTGPSSGAPPPS	20	20
Análogos de glucagón D ⁹ (6-29)				
			GLP-1 (nM)	EC ₅₀ Glucagón (nM) IC ₅₀
7	PLA 6, D9, D28	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	-700	tbd
8	PLA6, D9, K12E20 (lactama)	PLA-TSDYSKYLDERRAQDFVQWLMDT	21	13
9	PLA6, D9, E16K20 (lactama)	PLA-TSDYSKYLDERRAKDFVQWLMDT	4	6

5 **[0675]** En algunas realizaciones, el péptido que comprende la estructura general A-B-C es un péptido de Clase 5. En una realización específica, el péptido muestra al menos aproximadamente 50% del agonismo máximo conseguido por GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 y al menos una inhibición de aproximadamente 50% de la respuesta máxima conseguida por glucagón natural en el receptor de glucagón. En otra realización específica, el péptido muestra al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o aproximadamente 100% del agonismo máximo conseguido por GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. Alternativa o adicionalmente, el péptido puede mostrar al menos aproximadamente 55%, al menos aproximadamente 60%, al menos aproximadamente 70%, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, o aproximadamente el 100% de inhibición de la respuesta máxima conseguida por glucagón natural en el receptor de glucagón.

20 **[0676]** En algunas realizaciones, se proporciona un péptido de la clase 5 o conjugado del mismo, que comprende:
 (1) las modificaciones que confieren actividad agonista de glucagón, incluyendo, pero no limitado a:
 (a) sustitución de la Phe en la posición 6 con PLA (según la numeración de los aminoácidos del glucagón de tipo natural), opcionalmente con la supresión de 1 a 5 aminoácidos de la N-terminal de glucagón de tipo natural; o
 (b) la supresión de 2 a 5 aminoácidos del extremo N-terminal de glucagón de tipo natural; opcionalmente con sustitución de Asp en la posición 9 de glucagón de tipo natural con ácido glutámico, ácido homoglutámico o un derivado de ácido sulfónico de la cisteína (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural); y
 25 (2) las modificaciones que confieren GLP-1 actividad agonista, incluyendo, pero no limitado a:
 (a) inserción o sustitución de alfa, alfa aminoácido disustituida dentro de los aminoácidos 12-29 de glucagón de tipo natural, por ejemplo en uno, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24 o 29 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural); o

- (b) la introducción de un puente intramolecular dentro de los aminoácidos 12-29 de glucagón de tipo natural, por ejemplo, un puente salino o un puente de lactama u otro tipo de enlace covalente; o
- (c) sustitución de aminoácido en una o más de las posiciones 2, 3, 17, 18, 21, 23, o 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón natural) con el correspondiente aminoácido de GLP-1, por ejemplo Ser2 se sustituye con Ala, Gln3 se sustituye con Glu, Arg17 se sustituye con Gln, Arg en la posición 18 se sustituye con Ala, Asp en la posición 21 se sustituye con Glu, Val en la posición 23 se sustituye con Ile, y/o Gln en la posición 24 se sustituye con Ala; o
- (d) otras modificaciones que estabilizan la estructura alfa-hélice aproximadamente las posiciones de aminoácidos 12-29 según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural; y
- (3) otras modificaciones que mejoran 1 GLP-actividad agonista, por ejemplo una amida o éster C-terminal en lugar de un carboxilato C-terminal; y, opcionalmente,
- (4) una o más de las siguientes modificaciones:
- (a) unión covalente a un resto hidrófilo, tal como polietilenglicol, por ejemplo en el extremo N-terminal, o en la posición 6, 16, 17, 20, 21, 24, 29, 40 o en el aminoácido C-terminal; y/o
- (b) acilación o alquilación; y opcionalmente
- (5) uno o más de las siguientes modificaciones adicionales:
- (a) unión covalente de los aminoácidos, a la N-terminal, por ejemplo, 1-5 aminoácidos con el N-terminal, opcionalmente a través de un enlace éster a PLA en la posición 6 (según la numeración de glucagón de tipo natural), opcionalmente junto con modificaciones en la posición 1 o 2, por ejemplo como se describe en el presente documento, que mejoran la resistencia a la escisión de DPP-IV;
- (b) delección de los aminoácidos en las posiciones 29 y/o 28, y, opcionalmente, la posición 27 (según la numeración de glucagón de tipo natural);
- (c) unión covalente de aminoácidos al extremo C-terminal;
- (d) sustituciones no conservativas, sustituciones conservativas, adiciones o supresiones mientras que conservan la actividad deseada, por ejemplo, las sustituciones conservativas en uno o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29, la sustitución de Tyr en la posición 10 con Val o Phe, sustitución de Lys en la posición 12 con Arg, sustitución de uno o más de estas posiciones con Ala;
- (e) modificación del ácido aspártico en la posición 15, por ejemplo, por sustitución con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o el ácido homocisteico, lo 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 tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos, o alternativamente con una cualquiera de glutamina, ácido homoglutámico, o ácido homocisteico, que también pueden reducir la degradación debido a la escisión del enlace Asp15-Ser16;
- (f) modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, por sustitución con leucina o norleucina, para reducir la degradación oxidativa;
- (g) la modificación de la Gln en la posición 20 o 24, por ejemplo, por sustitución con Ala o Aib, para reducir la degradación que se produce a través de la desamidación de Gln
- modificación (h) 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 una succinimida cíclica intermedia seguido de isomerización a iso-aspartato;
- (j) la homodimerización o heterodimerización como se describe en el presente documento; y
- (k) combinaciones de los anteriores.

[0677] Se entiende que cualquiera de las modificaciones de la misma clase pueden combinarse entre sí y/o se combinan modificaciones de las diferentes clases. Por ejemplo, las modificaciones de (1) (a) pueden combinarse con (2) (a) y (3); (1) (a) pueden combinarse con (2) (b), por ejemplo puente de lactama o puente de sal, y (3); (1) (a) pueden combinarse con (2) (c) y (3); (1) (b) pueden combinarse con (2) (a) y (3); (1) (b) pueden combinarse con (2) (b), por ejemplo puente de lactama o puente de sal, y (3); (1) (b) pueden combinarse con (2) (c) y (3); cualquiera de los anteriores pueden combinarse con (4) (a) y/o (4) (b); y cualquiera de los anteriores pueden combinarse con cualquiera de (5) (a) a (5) (k).

[0678] En realizaciones de ejemplo, el aminoácido alfa, alfa disustituido Aib está sustituido en una, dos, tres o todas de las posiciones 16, 20, 21, o 24 (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural).

[0679] En realizaciones de ejemplo, el puente intramolecular es un puente de sal.

[0680] En otros ejemplos de realización, el puente intramolecular es un enlace covalente, por ejemplo un puente de lactama. En algunas realizaciones, el puente de lactama está entre los aminoácidos en las posiciones 9 y 12, los aminoácidos en las posiciones 12 y 16, los aminoácidos en las posiciones 16 y 20, los aminoácidos en las posiciones 20 y 24, o los aminoácidos en las las posiciones 24 y 28 (según la numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1401).

[0681] En realizaciones de ejemplo, la acilación o alquilación es en la posición 6, 10, 20 o 24 o en el extremo N-terminal o C-terminal (según la numeración de aminoácidos del glucagón de tipo natural) SEQ ID NO: 1401).

[0682] En realizaciones de ejemplo, las modificaciones incluyen:

- (i) sustitución de Asp en la posición 15 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401) con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;
- (ii) sustitución de Ser en la posición 16 (según la numeración de la SEQ ID NO: 1401) con ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico, y ácido homocisteico;
- 5 (iii) sustitución de Asn en la posición 28 con un aminoácido cargado;
- (iv) 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;
- (v) sustitución en la posición 28 con Asn, Asp, o Glu;
- (vi) sustitución en la posición 28 con Asp;
- 10 (vii) sustitución en la posición 28 con Glu;
- (viii) sustitución de Thr en la posición 29 con un aminoácido cargado;
- (ix) 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;
- (x) sustitución en la posición 29 con Asp, Glu o Lys;
- 15 (xi) sustitución en la posición 29 con Glu;
- (xii) la inserción de 1-3 aminoácidos cargados después de la posición 29;
- (xiii) inserción después de la posición 29 de Glu o Lys;
- (xiv) inserción después de la posición 29 de Gly-Lys o Lys-Lys; o combinaciones de los mismos.

20 **[0683]** Cualquiera de las modificaciones descritas anteriormente, que aumentan la actividad agonista del receptor de GLP-1, la actividad agonista del receptor de glucagón, la solubilidad del péptido y/o la estabilidad del péptido se pueden aplicar individualmente o en combinación.

Modificación para mejorar la estabilidad,

25 **[0684]** Según algunas realizaciones de la péptidos de clase 5 descritos en el presente documento se pueden modificar adicionalmente para incluir la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1421 (GPSSGAPPPS), o SEQ ID NO: 1450, unido al aminoácido carboxi terminal (posición 24) del péptido de Clase 5 y se administró a los individuos para inducir la pérdida de peso o ayudar en el mantenimiento del peso. Más en particular, el péptido de Clase 5

30 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, SEQ ID NO: 1408, SEQ ID NO: 1409, SEQ ID NO: 1412, SEQ ID NO: 1413, SEQ ID NO: 1414, SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1418, SEQ ID NO: 1419, SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424 y SEQ ID NO: 1425 y que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1421 (GPSSGAPPPS), o SEQ ID NO: 1450, unido al aminoácido carboxi terminal (posición 24) del péptido o Clase 5

35 péptido, se utiliza para suprimir el apetito y la inducción de mantenimiento de la pérdida de peso/peso. En algunas realizaciones, el péptido administrado o péptido de clase 5 comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1418 y SEQ ID NO: 1419, que comprende además la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1421 (GPSSGAPPPS) unido al ácido carboxi terminal de amino (posición 24) del péptido de Clase 5. En algunas realizaciones, el procedimiento comprende administrar un péptido o péptidos de Clase 5, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 445 o SEQ ID NO: 1446.

[0685] Por consiguiente, se espera que los péptidos de clase 5 descritos en el presente documento pueden modificarse de manera similar para disminuir su susceptibilidad a la escisión química prematura en tampones acuosos. Según algunas realizaciones de los péptidos de clase 5 descritos en el presente documento pueden

45 modificarse adicionalmente para aumentar su estabilidad en soluciones acuosas mediante la sustitución del aminoácido aspártico natural, situado en la posición 15 del glucagón natural correspondiente, con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en cisteico ácido, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico. Según algunas otras realizaciones el residuo de ácido aspártico en la posición 10 del péptido de clase 5 de SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID N°: 1408 pueden estar sustituidos con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido cisteico, ácido glutámico, ácido homoglutámico y ácido homocisteico, y en algunas realizaciones el ácido aspártico natural en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID NO: 1408 se sustituye con ácido glutámico. Según algunas realizaciones se proporciona una clase de 5 péptido que tiene una estabilidad mejorada en soluciones acuosas en el que el

50 antagonista comprende una secuencia modificada de la SEQ ID NO: 1409, en el que la modificación comprende la sustitución de la Asp en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1409 con Glu. En algunas realizaciones se proporciona un péptido de clase 5 comprende una forma de secuencia seleccionada del grupo constituido por SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424 y SEQ ID NO: 1425. En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 se amidado.

60 **[0686]** La secuencia Asp-Ser en la posición 15-16 de glucagón natural ha sido identificado como un dipéptido único inestable que conduce a la escisión química prematura de la hormona natural en tampones acuosos. Por ejemplo, cuando se mantiene a 0,01 N HCl a 37°C durante 2 semanas, más del 50% de la glucagón natural se puede escindir en fragmentos. Los dos péptidos de escisión liberadas 1-15 y 16-29 están desprovistos de actividad biológica similar al glucagón y por lo tanto representan una limitación de la pre-formulación acuosa de glucagón y sus análogos

65 relacionados. La sustitución química selectiva de la Asp en la posición 15 del glucagón natural con Glu ha observado para eliminar virtualmente la escisión química del enlace 15-16 péptido.

[0687] En otras realizaciones todavía más de ejemplo, cualquiera de los compuestos anteriores se pueden modificar adicionalmente para mejorar la estabilidad mediante la modificación del aminoácido correspondiente a la posición 15 o 16 de glucagón natural, para reducir la degradación del péptido con el tiempo, especialmente en ácido o alcalino tampones.

Modificación para mejorar la solubilidad,

[0688] El péptido de clase 5 puede modificarse adicionalmente para mejorar la solubilidad del péptido en soluciones acuosas a pH fisiológico, en ciertos aspectos, al tiempo que conserva el antagonista de glucagón y la actividad agonista de GLP-1. La introducción de grupos hidrófilos en las posiciones correspondientes a las posiciones 12, 15, 16, 19 y 24 del péptido de la SEQ ID NO: 1405, o en las posiciones 12, 16, 19 o 24 del péptido de la SEQ ID NO: 1406 puede mejorar la solubilidad de los péptidos resultantes en soluciones que tienen un pH fisiológico, mientras que conserva el padre compuestos antagonistas de glucagón y la actividad agonista de GLP. Por lo tanto, en algunas realizaciones el descrito actualmente péptido de clase 5 que se modifica adicionalmente para comprender uno o más grupos hidrófilos unidos covalentemente a las cadenas laterales de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 12, 15, 16, 19 y 24 del péptido de la SEQ ID NO: 1 405 o SEQ ID NO: 1406. En una realización adicional las cadenas laterales de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 16 y 19 de la SEQ ID NO: 1 405 o SEQ ID NO: 1 406 están unidas covalentemente a grupos hidrófilos, y en algunas realizaciones, el grupo hidrófilo es polietilenglicol (PEG).

[0689] Los péptidos relacionados con glucagón de clase 5 pueden ser modificados mediante la introducción de carga en su extremo carboxi para mejorar la solubilidad del péptido al tiempo que conserva las propiedades agonistas del péptido. La solubilidad mejorada permite la preparación y almacenamiento de soluciones de glucagón a pH casi neutro. La formulación de soluciones de glucagón a valores de pH relativamente neutro (por ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0) mejora la estabilidad a largo plazo de la péptidos de clase 5.

[0690] Los solicitantes prevén que los péptidos de clase 5 descritos en el presente documento pueden modificarse de manera similar para mejorar su solubilidad en soluciones acuosas a pH relativamente neutro (por ejemplo pH de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0), en algunos casos, al tiempo que conserva un antagonista de glucagón y GLP-1 actividad. En consecuencia, algunas otras realizaciones se dirige a un antagonista de glucagón/GLP-1 de la SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID NO: 1408 que ha sido modificado aún más con respecto a los aminoácidos naturales presentes en las posiciones 6-29 de la glucagón de tipo natural (SEQ ID nO: 1401) para añadir carga al péptido por la sustitución de ácidos naturales no cargados aminoácidos con aminoácidos cargados, o la adición de aminoácidos cargados al extremo carboxi. Según algunas realizaciones, uno a tres de los no cargados aminoácidos naturales de la péptidos de clase 5 descritos en el presente documento se sustituyen con un aminoácido cargado. En algunas realizaciones, el aminoácido cargado se selecciona del grupo que consiste en lisina, arginina, histidina, ácido aspártico y ácido glutámico. Más en particular, los solicitantes han descubierto que sustituyendo el aminoácido que se produce normalmente corresponde a la posición 28 y/o 29 (en relación con el glucagón natural) con aminoácidos cargados, y/o la adición de uno a dos aminoácidos cargados en el término carboxi de la péptido, mejora la solubilidad y la estabilidad del péptido de clase 5 en soluciones acuosas a pHs fisiológicamente relevantes (es decir, un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5). Según ello tales modificaciones de péptidos de clase 5 se prevé que tenga un efecto similar sobre la solubilidad en soluciones acuosas, particularmente a un pH que varía de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,0, al tiempo que conserva la actividad biológica del péptido precursor.

[0691] Según algunas realizaciones, el péptido de clase 5 de la SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407 o la SEQ ID NO: 1 408 se modifica mediante la sustitución del aminoácido natural en la posición 23 y/o 24 de esas secuencias con un aminoácido cargado negativamente (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 del péptido. En una realización alternativa de un péptido de clase 5 que comprende la SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID NO: 1 408 se modifica mediante la sustitución del aminoácido natural en la posición 24 de la SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1 407 o SEQ ID NO: 1408 con un aminoácido cargado positivamente (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) y opcionalmente la adición de uno o dos cargado positivamente amino ácido (por ejemplo, lisina, arginina o histidina) en el extremo carboxi terminal del péptido. Según algunas realizaciones se proporciona un péptido de clase 5 que tiene una mejor solubilidad y estabilidad en el que el análogo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 con la condición de que al menos uno aminoácidos en la posición, 23, o 24 de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 está sustituido con un ácido aminoácido y/o un aminoácido ácido adicional añadido en el extremo carboxi de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451. En algunas realizaciones los aminoácidos ácidos se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Asp, Glu, ácido cisteico y ácido homocisteico.

[0692] Según algunas realizaciones, un péptido de clase 5 que tiene una mejor solubilidad y estabilidad se proporciona en el que el antagonista comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1 418 o SEQ ID NO: 1419. Según algunas otras realizaciones se proporciona un agonista de glucagón que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1416 o la SEQ ID N°: 1417. En algunas realizaciones, el

péptido de clase 5 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1420.

[0693] Según algunas otras realizaciones se proporciona un péptido de clase 5, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451. En algunas realizaciones, la posición 4 de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 es aspártico ácido, ácido glutámico, ácido homoglutamínico, ácido cisteico o el ácido homocisteico, y en algunas realizaciones la posición 4 es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico o el ácido homocisteico, y en una posición forma de realización adicional 4 de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 es ácido aspártico o ácido glutámico, y en algunas realizaciones la posición 4 de la SEQ ID NO: 1415 o la SEQ ID NO: 1 451 es el ácido aspártico. En algunas realizaciones se proporciona un péptido de clase 5, que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 donde la posición 4 de la SEQ ID NO: 1 415 es el ácido aspártico y la posición 10 de la SEQ ID NO: 1 415 es el ácido glutámico. En una realización adicional el aminoácido C-terminal de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1 451 se modifica para sustituir el grupo ácido carboxílico natural con un grupo de carga neutra, tal como una amida o éster.

15 *Fusiones de péptidos de Clase 5*

[0694] En una realización adicional, el aminoácido carboxi terminal del péptido de clase 5 se describe en el presente documento está covalentemente unido a un segundo péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1421, 1426, 1427, y 1450. Para ejemplo, en algunas realizaciones, el péptido de Clase 5 de la SEQ ID NO: 1415, SEQ ID NO: 1451, SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, SEQ ID NO: 1408, SEQ ID NO: 1412, SEQ ID NO: 1413, SEQ ID NO: 1414, SEQ ID NO: 1416, SEQ ID NO: 1417, SEQ ID NO: 1418, SEQ ID NO: 1419, SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424 y SEQ ID NO: 1 425 se une covalentemente a un segundo péptido que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1421 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 1426 (KRNRNIA), SEQ ID NO: 1427 (KRNR) y SEQ ID NO: 1450 (GPSSGAPPPSX).

[0695] En algunas realizaciones, se proporciona un dímero peptídico clase 5 que comprende dos secuencias seleccionadas independientemente del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1405, SEQ ID NO: 1406, SEQ ID NO: 1407, SEQ ID NO: 1408, SEQ ID NO: 1409, SEQ ID NO: 1422, SEQ ID NO: 1423, SEQ ID NO: 1424 y SEQ ID NO: 1425 que comprende además una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1421 (GPSSGAPPPS) unido al aminoácido carboxi terminal de la el péptido de clase 5.

[0696] En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 se modifica adicionalmente mediante truncamiento o delección de uno o dos aminoácidos de la C-terminal del péptido (es decir, el truncamiento de los aminoácidos en la posición 29 o en las posiciones 28 y 29 de glucagón natural). Preferiblemente truncamiento no afecta a la actividad (por ejemplo, glucagón antagonismo/GLP-1 agonismo) de un 5 péptido clase.

Conjugados de péptidos de clase 5

[0697] También se proporcionan conjugados de péptidos de clase 5, en el que el péptido de glucagón está unido, opcionalmente a través de un enlace covalente y opcionalmente a través de un enlazador, a un resto conjugado.

[0698] En las realizaciones en donde el péptido de clase 5 comprende una cadena de polietilenglicol, la cadena de polietilenglicol puede estar en la forma de una cadena lineal o puede ser ramificado. Según algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 10.000 Daltons. En algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado entre el intervalo de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones de la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio seleccionado de aproximadamente 1000 a aproximadamente 2000 Daltons. En algunas realizaciones, la cadena de polietilenglicol tiene un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 Daltons.

[0699] En algunas realizaciones, la clas pegilados 5 péptido comprende un péptido constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 en el que la cadena de polietilenglicol está ligado a un aminoácido seleccionado de entre las posiciones 11, 12, 15, 16, 19 y 24 de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451, y el peso molecular de la cadena de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones el pegilado péptido de clase 5 comprende un péptido constituido por la secuencia de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 en el que la cadena de polietilenglicol está ligado al aminoácido en la posición 16 o 19 de la SEQ ID NO: 1415 o SEQ ID NO: 1451, y el peso molecular de la cadena de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En una realización adicional, el péptido de clase 5 modificado comprende dos o más cadenas de polietilenglicol unidos covalentemente al péptido en el que el peso molecular total de las cadenas de glucagón es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000 Daltons. En algunas realizaciones, el péptido de clase 5 comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1 451 en el que una cadena de polietilenglicol está ligado al aminoácido en las posiciones 16 y 19 de la SEQ ID NO: 1 415 o SEQ ID NO: 1451 y el peso molecular combinado de los dos cadenas de PEG es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 5.000

Daltons.

[0700] La clase de péptido relacionado con glucagón 5 puede comprender la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NOs: 1401-1518, opcionalmente con hasta 1, 2, 3, 4, o 5 modificaciones adicionales que retienen antagonista de glucagón y GLP-1 actividad agonista.

El grupo de unión (L)

[0701] Como se describe en el presente documento, los presentes divulgaciones proporcionar péptidos de la superfamilia del glucagón conjugados con ligandos de GR que tiene la fórmula **Q-L-Y**, en el que **L** es un grupo de unión o un enlace químico. En algunas realizaciones, **L** es estable *in vivo*. En algunas realizaciones, **L** es hidrolizable *in vivo*. En algunas realizaciones, **L** es metaestable *in vivo*.

[0702] **Q** e **Y** pueden ser unidos entre sí a través de **L** usando agentes y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica enlazan estándar. En algunos aspectos, **Q** e **Y** están fusionados directamente y **L** es un enlace. En otros aspectos, **Q** e **Y** se fusionan a través de un grupo de unión **L**. Por ejemplo, en algunas realizaciones, **Q** e **Y** están unidos entre sí mediante un enlace peptídico, opcionalmente a través de un péptido o amino espaciador de ácido. En algunas realizaciones, **Q** e **Y** están unidos entre sí a través de conjugación química, opcionalmente a través de un grupo de unión (**L**). En algunas realizaciones, **L** está conjugado directamente a cada uno de **Q** y **Y**.

[0703] conjugación química puede tener lugar mediante la reacción de un grupo reactivo nucleófilo de un compuesto a un grupo reactivo electrofílico de otro compuesto. En algunas otras realizaciones, cuando **L** es un enlace, **Q** es conjugado a **Y**, ya sea por reacción de un resto reactivo nucleófilo sobre **Q** con un resto reactivo electrofílico en **Y**, o por reacción de un resto reactivo electrofílico en **Q** con un resto reactivo nucleófilo sobre **Y**. En realizaciones cuando **L** es un grupo que une **Q** e **Y** juntos, **Q** y/o **Y** puede ser conjugado a **L** ya sea por reacción de un resto reactivo nucleófilo sobre **Q** y/o **Y** con un resto reactivo electrofílico en **L**, o por reacción de un resto reactivo electrofílico en **Q** y/o **Y** con un resto reactivo nucleófilo sobre ejemplos **L**. no limitantes de grupos reactivos nucleófilos incluyen amino, tiol e hidroxilo. Ejemplos no limitativos de grupos reactivos electrofílicos incluyen carboxilo, cloruro de acilo, anhídrido, éster, éster de succinimida, haluro de alquilo, éster de sulfonato, maleimido, haloacetilo, e isocianato. En realizaciones en las que **Q** e **Y** se conjugan entre sí por reacción de un ácido carboxílico con una amina, un agente de activación se puede usar para formar un éster activado del ácido carboxílico.

[0704] El éster activado del ácido carboxílico puede ser, por ejemplo, N-hidroxisuccinimida (NHS), tosilato (Tos), mesilato, triflato, una carbodiimida, o un hexafluorofosfato. En algunas realizaciones, la carbodiimida es 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 1,1'-carbonyldiimidazol (CDI), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), o 1,3-diisopropilcarbodiimida (DICD). En algunas realizaciones, el hexafluorofosfato se selecciona de un grupo que consiste en hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxi-tris (dimetilamino) fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), hexafluorofosfato de 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio (HATU), y hexafluorofosfato de O-benzotriazol-N, N, N', N'-tetrametil-uronio (HBTU).

[0705] En algunas realizaciones, **Q** comprende un grupo reactivo nucleófilo (por ejemplo, el grupo amino, grupo tiol, o un grupo hidroxilo de la cadena lateral de lisina, cisteína o serina) que es capaz de conjugarse con un grupo reactivo electrofílico en **Y** o **L**. en algunas realizaciones, **Q** comprende un grupo reactivo electrofílico (por ejemplo, el grupo carboxilato de la cadena lateral de Asp o Glu) que es capaz de conjugarse a un grupo reactivo nucleófilo sobre **Y** o **L**. en algunas realizaciones, **Q** es modificado químicamente para comprender un grupo reactivo que es capaz de conjugarse directamente a **Y** o **L**. en algunas realizaciones, **Q** es modificado en el extremo C-terminal a comprender un aminoácido natural o no natural con una cadena lateral nucleófila, tal como un aminoácido representado por la Fórmula I, fórmula II, o fórmula III, como se describió anteriormente en el presente documento (véase la acilación y alquilación). En realizaciones de ejemplo, el aminoácido C-terminal de **Q** se selecciona del grupo que consiste en lisina, ornitina, serina, cisteína y homocisteína. Por ejemplo, el aminoácido C-terminal de **Q** puede ser modificado para comprender un residuo de lisina. En algunas realizaciones, **Q** es modificado en el aminoácido C-terminal a comprender un aminoácido natural o no natural con una cadena lateral electrofílica tal como, por ejemplo, Asp y Glu. En algunas realizaciones, un aminoácido interno de **Q** está sustituido con un aminoácido natural o no natural que tiene una cadena lateral nucleófila, tal como un aminoácido representado por la Fórmula I, Fórmula II, o fórmula III, como se describe anteriormente en el presente documento (ver acilación y alquilación). En realizaciones de ejemplo, el aminoácido interno de **Q** que está sustituido se selecciona del grupo que consiste en lisina, ornitina, serina, cisteína y homocisteína. Por ejemplo, un aminoácido interno de **Q** puede estar sustituido con un residuo de lisina. En algunas realizaciones, un aminoácido interno de **Q** está sustituido con un aminoácido natural o no natural con una cadena lateral electrofílica, tal como, por ejemplo, Asp y Glu.

[0706] En algunas realizaciones, **Y** comprende un grupo reactivo que es capaz de conjugarse directamente a **Q** o para **L**. En algunas realizaciones, **Y** comprende un grupo reactivo nucleófilo (por ejemplo, amina, tiol, hidroxilo) que es capaz de conjugarse a un electrofílico grupo reactivo en **Q** o **L**. en algunas realizaciones, **Y** comprende un grupo reactivo electrofílico (por ejemplo, grupo carboxilo, forma activada de un grupo carboxilo, un compuesto con un grupo saliente) que es capaz de conjugarse a un grupo reactivo nucleófilo sobre **Q** o **L**. en algunas realizaciones, **Y** es modificado químicamente para comprender o bien un grupo reactivo nucleófilo que es capaz de conjugarse con un

grupo reactivo electrofílico en **Q** o **L**. en algunas realizaciones, y es modificado químicamente para comprender un grupo reactivo electrófilo que es capaz de conjugarse a una grupo reactivo nucleófilo sobre **Q** o **L**.

5 **[0707]** En algunas realizaciones, la conjugación se puede llevar a cabo a través de organosilanos, E, G, aminosilano tratados con glutaraldehído; carbonildiimidazol (CDI) activación de los grupos silanol; o la utilización de dendrímeros. Una variedad de dendrímeros son conocidos en la técnica e incluyen poli(amidoamina) (PAMAM), que se sintetizan por el procedimiento divergente a partir de amoniaco o etilendiamina reactivos núcleo iniciador; una sub-clase de dendrímeros PAMAM basados en un núcleo de tris-aminoetileno-imina; radialmente poli capas (amidoamina-organosilicio) dendrímeros (PAMAMOS), que se invierte micelas unimoleculares que consisten en hidrófila poliamidoamina, nucleófilo (PAMAM) interiores y orgánico de silicio hidrófobo (OS) exteriores; Poli(propilenimina) (PPI) dendrímeros, que son generalmente aminos poli-alquilo que tienen aminos primarias como grupos terminales, mientras que el interior dendrímero consta de numerosos de aminos Tris-propileno terciarias; Poli(propileno amina) (POPAM) dendrímeros; Diaminobutano (DAB) dendrímeros; dendrímeros anfífilos; dendrímeros micelares que son micelas unimoleculares de polifenilenos ramificados hiper soluble en agua; dendrímeros de polilisina; y dendrímeros basados en hiper éter poli-bencil ramificados esqueleto.

20 **[0708]** En algunas realizaciones, la conjugación se puede llevar a cabo a través de metátesis de olefinas. En algunas realizaciones, **Y** y **Q**, **Y** y **L**, o **Q** y **L** comprenden ambos un resto alqueno o alquino que es capaz de sufrir metátesis. En algunas realizaciones un catalizador adecuado (por ejemplo, cobre, rutenio) se utiliza para acelerar la reacción de metátesis. Los procedimientos adecuados de llevar a cabo reacciones de metátesis de olefinas se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Schafmeister et al., J. Am. Chem. Soc. 122: 5891-5892 (2000), Walensky et al, Science 305: 1466-1470 (2004), y Blackwell et al, Angew, Chem, Int... Ed. 37: desde 3281 hasta 3284 (1998).

25 **[0709]** En algunas realizaciones, la conjugación se puede llevar a cabo usando química de clic. A "reacción de Click" es amplia en alcance y fácil de realizar, utiliza sólo reactivos fácilmente disponibles, y es insensible a oxígeno y agua. En algunas realizaciones, la reacción de clic es una reacción de cicloadición entre un grupo alquino y un grupo azido para formar un grupo triazolilo. En algunas realizaciones, la reacción de Click utiliza un catalizador de cobre o rutenio. Los procedimientos adecuados de llevar a cabo reacciones de clic se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Kolb y otros, Drug Discovery Today. 8: 1128 (2003); Kolb et al., Angew. Chem. En t. Ed. 40: 2004 (2001); Rostovtsev et al., Angew. Chem. En t. Ed. 41: 2596 (2002); Tornøe et al., J. Org. Chem. 67: 3057 (2002); Manetsch et al., J. Am. Chem. Soc. 126: 12809 (2004); Lewis et al., Angew. Chem. En t. Ed. 41: 1053 (2002); Speers, J. Am. Chem. Soc. 125: 4686 (2003); Chan et al. Org. Letón. 6: 2853 (2004); Zhang et al., J. Am. Chem. Soc. 127: 15998 (2005); y Waser et al., J. Am. Chem. Soc. 127: 8294 (2005).

35 **[0710]** También se contempla la conjugación indirecta a través de parejas de unión específica de alta afinidad, por ejemplo estreptavidina/biotina o avidina/biotina o lectina/carbohidrato.

Modificación química de **Q** y/o **Y**

40 **[0711]** En algunas realizaciones, **Q** y/o **Y** se funcionalizan para comprender un grupo reactivo nucleófilo o un grupo reactivo electrófilo con un agente derivatizante orgánico. Este agente derivatizante es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o con los residuos o residuos C-terminales de los aminoácidos específicos en el **Q** y grupos funcionales en los grupos reactivos **Y**. en **Q** y/o **Y** incluyen, por ejemplo, aldehído, amino, éster, tiol, haloacetil alfa, maleimido o grupo hidrazino. Los agentes de derivatización incluyen, por ejemplo, éster de maleimidobenzilsulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica. Alternativamente, **Q** y/o **Y** puede unirse entre sí indirectamente a través de portadores intermedios, tales como portadores de polisacáridos o polipéptidos. Ejemplos de portadores de polisacáridos incluyen aminodextrano. Ejemplos de portadores de polipéptidos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutamico, ácido poliaspártico, co-polímeros de los mismos, y polímeros mixtos de estos aminoácidos y otros, por ejemplo, serinas, para conferir propiedades de solubilidad deseables en el soporte resultante cargado.

55 **[0712]** Los residuos cisteinilo más comúnmente se hacen reaccionar con haloacetatos alfa (y aminos correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos cisteinilo también se derivatizan mediante reacción con bromotrifluoroacetona, alfa-bromo-beta - (5-imidozoi) propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metilo 2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol, o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

60 **[0713]** Los residuos histidilo se derivatizan mediante reacción con dietilpirocarbonato a pH 5,5-7,0 porque este agente es relativamente específico para la cadena lateral histidil. el bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato de sodio 0,1 M a pH 6,0.

65 **[0714]** Los residuos de lisinilo y amino-terminal se hacen reaccionar con anhídridos de ácido carboxílico succínico u otros. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos

adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona, y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

5 [0715] Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo epsilon-amino de la arginina.

10 [0716] La modificación específica de los residuos tirosil puede realizarse, con interés particular en la introducción de marcadores espectrales en los residuos tirosilo por reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Más comúnmente, N-acetilimidazol y tetranitrometano se utilizan para formar especies O-acetil tirosil y derivados 3-nitro, respectivamente.

15 [0717] Los grupos laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas (RN-R'), donde R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4- etil) carbodiimida o 3- 1-etil-(carbodiimida 4-azonia-4,4-dimetilpentil). Además, los residuos aspartilo y glutamilo se convierten en residuos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio.

20 [0718] Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de serilo o treonilo residuos, la metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina, y cadenas laterales de histidina (TE Creighton, Proteínas: Estructura y Propiedades Moleculares, WH Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la desamidación de la asparagina o la glutamina, la acetilación de la amina N-terminal, y/o la amidación o esterificación del grupo ácido carboxílico C-terminal.

25 [0719] Otro tipo de modificación covalente implica química o enzimáticamente glucósidos de acoplamiento al péptido. Azúcar (s) puede estar unido a (a) arginina e histidina, (b) grupos carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres tales como los de la cisteína, (d) grupos hidroxilo libres tales como los de serina, treonina, o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos tales como los de tirosina, o triptófano, o (f) el grupo amida de la glutamina. Estos procedimientos se describen en WO87/05330 publicada el 11 de Sep. 1987, y en Aplin y Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., Pp. 259-306 (1981).

35 Estructura de la L

[0720] En algunas realizaciones, L es un enlace. En estas realizaciones, Q e Y se conjugan entre sí por reacción de un resto reactivo nucleófilo sobre Q con y resto reactivo electrófilo en Y. En realizaciones alternativas, Q e Y se conjugan entre sí por reacción de un resto reactivo electrófilo en Q con un resto nucleófilo sobre Y. En ejemplos de realización, L es un enlace amida que se forma tras la reacción de una amina en Q (por ejemplo, una amina epsilon de un residuo de lisina) con un grupo carboxilo en Y. En realizaciones alternativas, Q e Y se derivatizan con un derivatizante agente antes de la conjugación.

40 [0721] En algunas realizaciones, L es un grupo de unión. En algunas realizaciones, L es un enlazador bifuncional y comprende solamente dos grupos reactivos antes de la conjugación a Q e Y. En realizaciones en las que tanto Q e Y tienen grupos reactivos electrófilos, L comprende dos de los mismos o dos grupos nucleofílicos diferentes (por ejemplo, amina, hidroxilo, tiol) antes de la conjugación a Q e Y. En realizaciones en las que tanto Q e Y tienen grupos reactivos nucleófilos, L comprende dos de los mismos o dos grupos electrófilos diferentes (por ejemplo, grupo carboxilo, forma activada de un grupo carboxilo, un compuesto con un grupo saliente) antes de la conjugación a Q e Y. En realizaciones en las que uno de Q e Y tiene un grupo reactivo nucleófilo y el otro de Q e Y tiene un grupo reactivo electrófilo, L comprende un grupo reactivo nucleófilo y un grupo electrofílico antes de la conjugación a Q e Y.

45 [0722] L puede ser cualquier molécula con al menos dos grupos reactivos (antes de la conjugación a Q e Y) capaces de reaccionar con cada uno de Q e Y. En algunas realizaciones L tiene sólo dos grupos reactivos y es bifuncional. L (antes de la conjugación a los péptidos) puede ser representado por la Fórmula VI:

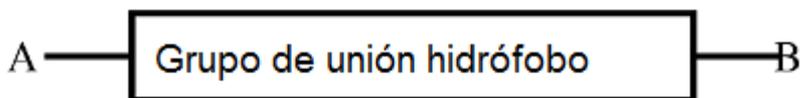


65 en la que A y B son independientemente grupos reactivos nucleófilos o electrófilos. En algunas realizaciones, A y B son ambos grupos nucleófilos o ambos grupos electrófilos. En algunas realizaciones uno de A o B es un grupo nucleófilo y el otro de A o B es un grupo electrófilo. A continuación, se muestran combinaciones no limitantes de A y B.

Ambos nucleófilos		Ambos electrófilos		Nucleófilo/electrófilo	
A	B	A	B	A	B
amino	amino	carboxilo	carboxilo	amino	carboxilo
amino	tiol	carboxilo	cloruro de acilo	amino	cloruro de acilo
amino	hidroxilo	carboxilo	anhídrido	amino	anhídrido
tiol	amino	carboxilo	éster	amino	éster
tiol	tiol	carboxilo	NHS	amino	NHS
tiol	hidroxilo	carboxilo	halógeno	amino	halógeno
hidroxilo	amino	carboxilo	éster sulfonato	amino	éster sulfonato
hidroxilo	tiol	carboxilo	maleimido	amino	maleimido
hidroxilo	hidroxilo	carboxilo	haloacetilo	amino	haloacetilo
		carboxilo	isocianato	amino	isocianato
		cloruro de acilo	carboxilo	tiol	carboxilo
		cloruro de acilo	cloruro de acilo	tiol	cloruro de acilo
		cloruro de acilo	anhídrido	tiol	anhídrido
		cloruro de acilo	éster	tiol	éster
		cloruro de acilo	NHS	tiol	NHS
		cloruro de acilo	halógeno	tiol	halógeno
		cloruro de acilo	éster sulfonato	tiol	éster sulfonato
		cloruro de acilo	maleimido	tiol	maleimido
		cloruro de acilo	haloacetilo	tiol	haloacetilo
		cloruro de acilo	isocianato	tiol	isocianato
		anhídrido	carboxilo	hidroxilo	carboxilo
		anhídrido	cloruro de acilo	hidroxilo	cloruro de acilo
		anhídrido	anhídrido	hidroxilo	anhídrido
		anhídrido	éster	hidroxilo	éster
		anhídrido	NHS	hidroxilo	NHS
		anhídrido	halógeno	hidroxilo	halógeno
		anhídrido	éster sulfonato	hidroxilo	éster sulfonato
		anhídrido	maleimido	hidroxilo	maleimido
		anhídrido	haloacetilo	hidroxilo	haloacetilo
		anhídrido	isocianato	hidroxilo	isocianato
		éster	carboxilo		
		éster	cloruro de acilo		
		éster	anhídrido		
		éster	éster		
		éster	NHS		
		éster	halógeno		
		éster	éster sulfonato		
		éster	maleimido		
		éster	haloacetilo		
		éster	isocianato		
		NHS	carboxilo		
		NHS	cloruro de acilo		
		NHS	anhídrido		
		NHS	éster		
		NHS	NHS		
		NHS	halógeno		
		NHS	éster sulfonato		
		NHS	maleimido		
		NHS	haloacetilo		
		NHS	isocianato		
		halógeno	carboxilo		
		halógeno	cloruro de acilo		
		halógeno	anhídrido		
		halógeno	éster		
		halógeno	NHS		
		halógeno	halógeno		
		halógeno	éster sulfonato		
		halógeno	maleimido		
		halógeno	haloacetilo		
		halógeno	isocianato		
		éster sulfonato	carboxilo		

	éster sulfonato	cloruro de acilo	
	éster sulfonato	anhídrido	
	éster sulfonato	éster	
	éster sulfonato	NHS	
	éster sulfonato	halógeno	
	éster sulfonato	éster sulfonato	
	éster sulfonato	maleimido	
	éster sulfonato	haloacetilo	
	éster sulfonato	isocianato	
	maleimido	carboxilo	
	maleimido	cloruro de acilo	
	maleimido	anhídrido	
	maleimido	éster	
	maleimido	NHS	
	maleimido	halógeno	
	maleimido	éster sulfonato	
	maleimido	maleimido	
	maleimido	haloacetilo	
	maleimido	isocianato	
	haloacetilo	carboxilo	
	haloacetilo	cloruro de acilo	
	haloacetilo	anhídrido	
	haloacetilo	éster	
	haloacetilo	NHS	
	haloacetilo	halógeno	
	haloacetilo	éster sulfonato	
	haloacetilo	maleimido	
	haloacetilo	haloacetilo	
	haloacetilo	isocianato	
	isocianato	carboxilo	
	isocianato	cloruro de acilo	
	isocianato	anhídrido	
	isocianato	éster	
	isocianato	NHS	
	isocianato	halógeno	
	isocianato	éster sulfonato	
	isocianato	maleimido	
	isocianato	haloacetilo	
	isocianato	isocianato	

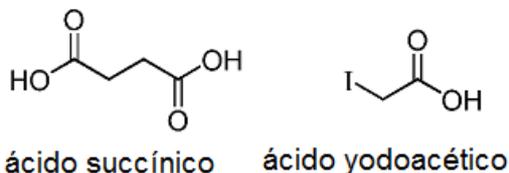
[0723] En algunas realizaciones, **L** es hidrófobo. Los enlazadores hidrófobos se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Bioconjugate Techniques, GT Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996). Los grupos de unión hidrófobos adecuados conocidos en la técnica incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxiocetanoico ácido y 8-mercaptocetanoico. Antes de la conjugación con los péptidos de la composición, el grupo de unión hidrófobo comprende al menos dos grupos reactivos (A y B), como se describe en el presente documento y como se muestra a continuación:



[0724] En algunas realizaciones, el grupo de unión hidrófobo comprende ya sea un maleimido o un grupo yodoacetilo y, o bien un ácido carboxílico o un ácido carboxílico activado (por ejemplo, éster de NHS) como los grupos reactivos. En estas realizaciones, el grupo maleimido o yodoacetilo se puede acoplar a un resto tiol en **Q** o **Y** y el ácido carboxílico o ácido carboxílico activado puede acoplarse a una amina en **Q** o **Y** con o sin el uso de un reactivo de acoplamiento. Cualquier agente de acoplamiento conocido por un experto en la técnica puede ser utilizado para acoplar el ácido carboxílico con la amina libre tal como, por ejemplo, DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU, y otros agentes de activación descrito en el presente documento. En realizaciones específicas, el grupo de unión hidrófobo comprende una cadena alifática de 2 a 100 grupos metileno en la que A y B son grupos o derivados de carboxilo de los mismos (por ejemplo, ácido succínico). En otras realizaciones específicas el **L** es el ácido

yodoacético.

5

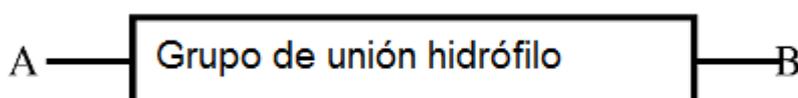


10

15

[0725] En algunas realizaciones, el grupo de unión es hidrófilo tal como, por ejemplo, polialquileño glicol. Antes de la conjugación con los péptidos de la composición, el grupo de unión hidrófilo comprende al menos dos grupos reactivos (A y B), como se describe en el presente documento y como se muestra a continuación:

20



25

En realizaciones específicas, el grupo de unión es el polietilenglicol (PEG). El PEG en ciertas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 100 Daltons a aproximadamente 10.000 Daltons, por ejemplo aproximadamente 500 Daltons a aproximadamente 5000 Daltons. El PEG en algunas realizaciones tiene un peso molecular de aproximadamente 10.000 Daltons a aproximadamente 40.000 Daltons.

30

[0726] En algunas realizaciones, el grupo de unión hidrófilo comprende ya sea un maleimido o un grupo yodoacetilo y, o bien un ácido carboxílico o un ácido carboxílico activado (por ejemplo, éster de NHS) como los grupos reactivos. En estas realizaciones, el grupo maleimido o yodoacetilo se puede acoplar a un resto tiol en **Q** o **Y** y el ácido carboxílico o ácido carboxílico activado puede acoplarse a una amina en **Q** o **Y** con o sin el uso de un reactivo de acoplamiento. Cualquier agente de acoplamiento apropiado conocido por un experto en la técnica puede ser utilizado para acoplar el ácido carboxílico con la amina, tal como, por ejemplo, DCC, DIC, HATU, HBTU, TBTU, y otros agentes de activación se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, la unión grupo es maleimido-PEG (20 kDa) -COOH, yodoacetil-PEG (20 kDa) -COOH, maleimido-PEG (20 kDa) -NHS, o yodoacetilo-PEG (20 kDa) -NHS.

35

40

[0727] En algunas realizaciones, el grupo de unión se compone de un aminoácido, un dipéptido, un tripéptido, o un polipéptido, donde el aminoácido, dipéptido, tripéptido, o polipéptido comprende al menos dos grupos de activación, como se describe en el presente documento. En algunas realizaciones, el grupo de unión (L) comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en: amino, éter, tioéter, maleimido, disulfuro, amida, éster, tioéster, alqueno, cicloalqueno, alquino, trizoyl, carbamato, carbonato, catepsina B escindible, y hidrazona.

45

[0728] En algunas realizaciones, **L** comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o de 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, de 2 a 10 átomos, de 5 a 10 átomos, o de 10 a 20 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena en la cadena principal del ligador se seleccionan del grupo que consiste de C, O, N, y S. Los átomos de la cadena y enlazadores pueden ser seleccionados según su solubilidad esperado (hidrofilia) a fin de proporcionar un más conjugado soluble. En algunas realizaciones, **L** proporciona un grupo funcional que está sujeto a la escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas que se encuentran en el tejido u órgano o célula diana. En algunas realizaciones, la longitud de **L** es el tiempo suficiente para reducir el potencial de impedimento estérico.

50

Estabilidad de **L** *in vivo*

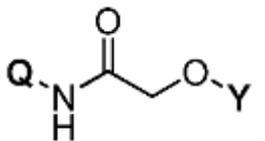
55

[0729] En algunas realizaciones, **L** es estable *in vivo*. En algunas realizaciones, **L** es estable en el suero sanguíneo durante al menos 5 minutos, por ejemplo menos de 25%, 20%, 15%, 10% o 5% del conjugado se escinde cuando se incubaron en el suero durante un período de 5 minutos. En otras realizaciones, **L** es estable en el suero sanguíneo de al menos 10, o 20, o 25, o 30, o 60, o 90, o 120 minutos, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 18 o 24 horas. En estas realizaciones, **L** no comprende un grupo funcional que es capaz de sufrir hidrólisis *in vivo*. En algunas realizaciones de ejemplo, **L** es estable en el suero sanguíneo de al menos aproximadamente 72 horas. Ejemplos no limitativos de grupos funcionales que no son capaces de experimentar una hidrólisis significativa *in vivo* incluyen amidas, éteres y tioéteres. Por ejemplo, el siguiente compuesto no es capaz de experimentar una hidrólisis significativa *in vivo*:

60

65

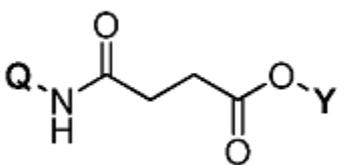
5



10

[0730] En algunas realizaciones, **L** es hidrolizable *in vivo*. En estas realizaciones, **L** comprende un grupo funcional que es capaz de sufrir hidrólisis *in vivo*. Ejemplos no limitativos de grupos funcionales que son capaces de sufrir hidrólisis *in vivo* incluyen ésteres, anhídridos, y tioésteres. Por ejemplo el siguiente compuesto es capaz de sufrir hidrólisis *in vivo*, ya que comprende un grupo éster:

15



20

25

[0731] En algunas realizaciones de ejemplo **L** es lábil y se somete a hidrólisis sustancial en 3 horas en el plasma sanguíneo a 37°C, con la hidrólisis completa dentro de las 6 horas. En algunas realizaciones de ejemplo, **L** no es lábil.

30

35

40

[0732] En algunas realizaciones, **L** es metaestable *in vivo*. En estas realizaciones, **L** comprende un grupo funcional que es capaz de ser químicamente o enzimáticamente escindido *in vivo* (por ejemplo, un ácido lábil, reducción lábil, o grupo funcional enzima lábil), opcionalmente en un período de tiempo. En estas realizaciones, **L** puede comprender, por ejemplo, un resto de hidrazona, un resto disulfuro, o un resto catepsina escindible. Cuando **L** es metaestable, y sin la intención de estar ligado por ninguna teoría en particular, el conjugado **Q-L-Y** es estable en un entorno extracelular, por ejemplo, estable en el suero sanguíneo de los períodos de tiempo descritos anteriormente, pero lábil en el ambiente o condiciones intracelulares que imitan la ambiente intracelular, de modo que escinde a la entrada en una célula. En algunas otras realizaciones cuando **L** es metaestable, **L** es estable en el suero sanguíneo de al menos aproximadamente 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 42, o 48 horas, por ejemplo, al menos aproximadamente 48, 54, 60, 66, o 72 horas, o aproximadamente 24-48, 48-72, 24-60, 36-48, 36-72, o 48-72 horas.

Conjugados Q-L-Y

Conjugación de Q e Y

45

50

[0733] La conjugación de **Q** a **Y** a través de **L** se puede llevar a cabo en cualquier posición dentro de **Q**, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición dentro de una extensión C-terminal, o el aminoácido C-terminal, siempre que la actividad de **Q** se retenga, si no mejora. Ejemplos no limitativos incluyen las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, 29, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43 (según el número de los aminoácidos de SEQ ID NO: 1601). En algunas realizaciones, **Y** se conjuga a **Q** a través de **L** en una o más de las posiciones 10, 20, 24, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 32, o 43. En realizaciones específicas, **Y** se conjuga a **Q** a través de **L** en la posición 10 y/o 40 de **Q**.

Actividad

55

Actividad en el receptor de glucagón y el receptor de glucocorticoides

60

65

[0734] En algunas realizaciones, **Q-L-Y** muestra actividad tanto en el receptor de glucagón y un receptor de glucocorticoides. En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de glucagón está dentro de aproximadamente 2000 veces, aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 75 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Y** en un receptor de glucocorticoides. En algunas realizaciones, la potencia de glucagón de **Q** está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de la potencia de **Y**.

[0735] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o de la EC₅₀ o la potencia de la **Q** en el receptor de glucagón dividida por la actividad relativa o de la EC₅₀ o potencia de **Y** en un receptor de glucocorticoides es menor que, o es aproximadamente X, donde X se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de glucagón dividido por el EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Y** en un receptor de glucocorticoides es de aproximadamente 1 a menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucagón de **Q** en comparación con la potencia de la hormona nuclear de **Y** es menor que, o es aproximadamente Z, donde Z se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucagón de **Q** en comparación con la potencia de glucocorticoide de **Y** es menor que 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una CE50 en el receptor de glucagón, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC₅₀ de **Y** en un receptor de glucocorticoides.

[0736] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la potencia o de la EC₅₀ de **Y** en un receptor de glucocorticoides dividida por la actividad relativa o la potencia o de la EC₅₀ de **Q** en el receptor de glucagón es menor que, o es de aproximadamente V, donde V se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Y** en un receptor de glucocorticoides dividido por el EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de glucagón es inferior a 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia del glucocorticoide de **Y** en comparación con la potencia de glucagón de **Q** es de menos de, o es aproximadamente W, en donde W se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia del glucocorticoide de **Y** en comparación con la potencia de glucagón de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Y** tiene una EC₅₀ en un receptor de glucocorticoides que es aproximadamente de 2 a aproximadamente 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC₅₀ de **Q** en el receptor de glucagón.

[0737] En algunas realizaciones, **Y** muestra al menos 0,001%, al menos 0,01%, al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de ligando endógeno en un receptor de glucocorticoides (la potencia de glucocorticoides) y **Q** muestra al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de glucagón natural en el receptor de glucagón (potencia de glucagón).

Actividad en el receptor de GLP-1 y el receptor de glucocorticoides

[0738] En algunas realizaciones, **Q-L-Y** muestra actividad tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucocorticoides. En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de GLP-1 está dentro de aproximadamente 2000 veces, aproximadamente 1000 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 75 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de la actividad (por ejemplo, la EC₅₀ o la actividad relativa o potencia) de **Y** en un receptor nuclear de hormona. En algunas realizaciones, la potencia GLP-1 de **Q** está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de la potencia de **Y**.

[0739] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o de la EC₅₀ o la potencia de la **Q** en el receptor de GLP-1 dividido por la actividad relativa o de la EC₅₀ o potencia de **Y** en un receptor de glucocorticoides es menor que, o es aproximadamente X, donde X se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GLP-1 dividido por el EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Y** en un receptor de glucocorticoides es de aproximadamente 1 a menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la GLP-1 potencia de **Q** en comparación con la potencia de glucocorticoides de **Y** es menor que, o es aproximadamente Z, donde Z se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, la relación de la GLP-1 potencia de **Q** en comparación con la potencia de glucocorticoides **Y** es menor que 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC₅₀ en el receptor de GLP-1 que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC₅₀ de **Y** en un receptor de glucocorticoides.

[0740] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la potencia o de la EC₅₀ de **Y** en un receptor de glucocorticoides dividida por la actividad relativa o la potencia o de la EC₅₀ de **Q** en el receptor de GLP-1 es menor que, o es de aproximadamente V, donde V se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC₅₀ o potencia o actividad relativa de **Y** en un receptor de glucocorticoides

dividida por la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GLP-1 es menor que 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de de glucocorticoides de **Y** en comparación con el GLP-1 potencia de **Q** es menor que, o es de aproximadamente, *W*, en donde *W* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de de glucocorticoides de **Y** en comparación con el GLP-1 potencia de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Y** tiene una EC_{50} en un receptor de glucocorticoides que es aproximadamente de 2 a aproximadamente 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC_{50} de **Q** en el receptor de GLP-1.

[0741] En algunas realizaciones, **Y** muestra al menos 0,001%, al menos 0,01%, al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de ligando endógeno en un receptor de glucocorticoides (la potencia de glucocorticoides) y muestra **Q** al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 (GLP-1 potencia).

Actividad en el receptor de GIP y el receptor de glucocorticoides

[0742] En algunas realizaciones, **Q-L-Y** muestra actividad tanto en el receptor de GIP como en un receptor de glucocorticoides. En algunas realizaciones, la actividad (por ejemplo, la EC_{50} o la actividad relativa o potencia) de **Q** en el receptor de GIP está dentro de aproximadamente 2000 veces, aproximadamente, 1000 veces, aproximadamente 100 veces, aproximadamente 75 veces, aproximadamente 60 veces, aproximadamente 50 veces, aproximadamente 40 veces, aproximadamente 30 veces, aproximadamente 20 veces, aproximadamente 10 veces, o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de la actividad (por ejemplo, la EC_{50} o la actividad relativa o potencia) de **Y** en un receptor nuclear de hormona. En algunas realizaciones, la potencia GIP de **Q** está dentro de aproximadamente 25, aproximadamente 20, aproximadamente 15, aproximadamente 10 o aproximadamente 5 veces diferente (mayor o menor) de la potencia de **Y**.

[0743] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o de la EC_{50} o la potencia de la **Q** en el receptor de GIP dividida por la actividad relativa o de la EC_{50} o potencia de **Y** en un receptor de glucocorticoides es menor que, o es aproximadamente *X*, donde *X* se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor GIP dividido por el EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Y** en un receptor de glucocorticoides es de aproximadamente 1 a menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia GIP de **Q** en comparación con la potencia de glucocorticoides de **Y** es menor que, o es aproximadamente *Z*, donde *Z* se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia GIP de **Q** en comparación con la potencia de glucocorticoides y es menor que 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Q** tiene una EC_{50} en el receptor de GIP, que es de 2 a 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC_{50} de **Y** en un receptor de glucocorticoides.

[0744] En algunas realizaciones, la relación de la actividad relativa o la potencia o de la EC_{50} de **Y** en un receptor de glucocorticoides dividida por la actividad relativa o la potencia o de la EC_{50} de **Q** en el receptor de GIP es menor que, o es aproximadamente *V*, donde *V* se selecciona a partir de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, ó 5. En algunas realizaciones, la relación de la EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Y** en un receptor de glucocorticoides dividido por el EC_{50} o potencia o actividad relativa de **Q** en el receptor de GIP es inferior a 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucocorticoides de **Y** en comparación con la potencia GIP de **Q** es de menos de, o es aproximadamente *W*, en donde *W* se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, y 5. En algunas realizaciones, la relación de la potencia de glucocorticoides de **Y** en comparación con la potencia GIP de **Q** es de menos de 5 (por ejemplo, aproximadamente 4, aproximadamente 3, aproximadamente 2, aproximadamente 1). En algunas realizaciones, **Y** tiene una EC_{50} en un receptor de glucocorticoides que es aproximadamente de 2 a aproximadamente 10 veces (por ejemplo, 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC_{50} de **Q** en el receptor de GIP.

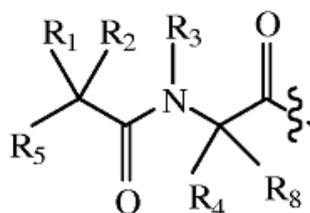
[0745] En algunas realizaciones, **Y** muestra al menos 0,001%, al menos 0,01%, al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de ligando endógeno en un receptor de glucocorticoides (la potencia de glucocorticoides) y muestra **Q** al menos 0,1% (por ejemplo, aproximadamente 0,5% o más, aproximadamente el 1% o más, aproximadamente 5% o más, aproximadamente 10% o más, o más) de la actividad de natural GIP en el receptor de GIP (GIP potencia).

Profármacos de **Q-L-Y**

[0746] En algunos aspectos de la divulgación, se proporcionan profármacos de **Q-L-Y** en el que el profármaco comprende un elemento de dipéptido profármaco (AB) unido covalentemente a un sitio activo de **Q** a través de un enlace amida, como se describe en Solicitud de Patente Internacional No. PCT US09/68745 (presentada el 18 de diciembre de 2009). La posterior eliminación del dipéptido en condiciones fisiológicas y en ausencia de la actividad enzimática, restaura la actividad completa al conjugado **Q-L-Y**.

[0747] En algunas realizaciones, se proporciona un profármaco de **Q-L-Y** que tiene la estructura general de **ABQ-L-Y**. En estas realizaciones A es un aminoácido o un hidroxiácido y B es un ácido N-alquilado amino ligado a **Q** mediante la formación de un enlace amida entre un grupo carboxilo de B (en AB) y una amina de **Q**. Además, en algunas realizaciones, a, B, o el aminoácido de **Q** a la que está unida AB, es un aminoácido no codificado, y escisión química de AB de **Q** es al menos aproximadamente 90% completa en aproximadamente 1 a aproximadamente 720 horas en PBS bajo condiciones fisiológicas condiciones. En otra realización, la escisión química de AB de **Q** es al menos aproximadamente 50% completa dentro de aproximadamente 1 hora o aproximadamente 1 semana en PBS en condiciones fisiológicas.

[0748] En alguna realización el elemento de profármaco dipéptido (A-B) comprende un compuesto que tiene la estructura general siguiente:



en la que
en la que

R^1 , R^2 , R^4 y R^8 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₁₈, alquenoilo C₂-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)SH, (alquil 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) (aril C₆-C₁₀)R⁷, (alquil C₁-C₄)(heteroarilo C₃-C₉) y alquil C₁-C₁₂(W1)alquilo C₁-C₁₂, en la que W1 es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, S y O, o R^1 y R^2 junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₁₂ o arilo; o R^4 y R^8 junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₆;

R^3 se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)NH₂, (alquil C₁-C₁₈)SH, (alquil C₀-C₄) cicloalquilo (C₃-C₆), (alquil C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (alquil C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀)R⁷ y (alquil C₁-C₄)(heteroarilo C₃-C₉) o R^4 y R^3 junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5 o 6 miembros;

R^5 es NHR⁶ u OH;

R^6 es H, alquilo C₁-C₈ o R^6 y R^1 junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5 ó 6 miembros; y

R^7 se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo C₁-C₁₈, alquenoilo C₂-C₁₈, (alquil C₀-C₄)CONH₂, (alquil C₀-C₄)COOH, (alquil C₀-C₄)NH₂, (alquil C₀-C₄)OH y halógeno.

[0749] En algunas realizaciones, el elemento de profármaco dipéptido está unido al extremo amino terminal de P. En otras otras realizaciones, el profármaco dipéptido está ligado a un aminoácido interno de Q, como se describe en Solicitud de Patente Internacional No. PCT US09/68745.

Realizaciones de ejemplo de Q-L-Y

[0750] En algunas realizaciones de la invención, los conjugados de péptido de glucagón de la superfamilia pueden ser representados por la siguiente fórmula:

Q-L-Y

en la que **Q** es un péptido superfamilia del glucagón, **Y** es un ligando GR, y **L** es un grupo de unión o un enlace.

[0751] En aspectos específicos, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano natural (SEQ ID NO: 1603). En algunos aspectos, **Q** comprende una secuencia de aminoácidos modificada de SEQ ID NO: 1603 que comprende 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 y hasta 1, hasta 2, de hasta 3, de hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 7, hasta 8, hasta 9, o hasta modificaciones de 10 aminoácidos (por ejemplo, acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en C-terminal, de sustitución) con relación a la humana natural GLP-1 de secuencia (SEQ ID NO: 1603). Por ejemplo, **Q** puede ser GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)

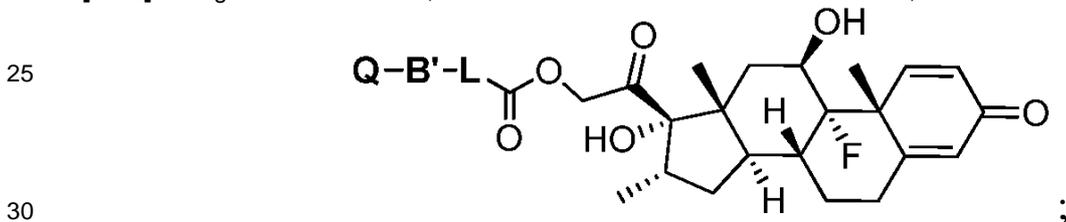
(SEQ ID NO.: 1647), GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰) (SEQ ID NO.: 1648), DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰) (SEQ ID NO.: 1649), GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰) (SEQ ID NO.: 1650).

5 **[0752]** En aspectos específicos, **Y** es un esteroide o un derivado con éstos y actúa en un receptor de estrógeno, un receptor de andrógenos, un receptor de glucocorticoides, o un receptor huérfano relacionado con RAR. En algunas realizaciones, **Y** comprende una estructura que permite o promueve la actividad agonista en un receptor de estrógeno, un receptor de andrógenos, un receptor de glucocorticoides, o un receptor huérfano relacionado con RAR, mientras que en otras realizaciones, **Y** es un antagonista de un receptor de estrógeno, un receptor de andrógenos, un receptor de glucocorticoides, o un receptor huérfano relacionado con RAR. Por ejemplo, **Y** puede ser estradiol, estrona, o colesterol.

15 **[0753]** En aspectos específicos, **Y** actúa en un receptor de glucocorticoides. Por ejemplo, **Y** puede ser cortisol, acetato de cortisona, beclometasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, betametasona, trimcinolona o dexametasona.

20 **[0754]** En aspectos específicos, **L** es estable *in vivo*. En algunas realizaciones, **L** comprende, por ejemplo, una amida, éter, carbamato, o tioéter. En aspectos alternativos, **L** es hidrolizable *in vivo*. En algunas realizaciones, **L** comprende un éster, anhídrido, o tioéster. En otros aspectos, **L** es metaestable *in vivo*. En algunos aspectos, **L** es lábil en medio ácido (por ejemplo, comprende resto de hidrazona), la reducción lábil (por ejemplo, comprende un resto disulfuro), o lábil a enzimas (por ejemplo, comprende un resto lábil a catepsina B).

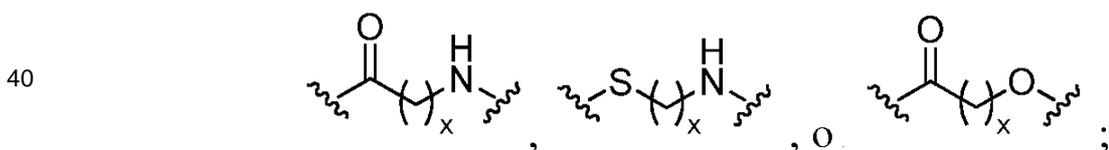
[0755] En algunas realizaciones, **Y** es dexametasona. En estas realizaciones, la estructura de **Q-L-Y** puede incluir:



en la que

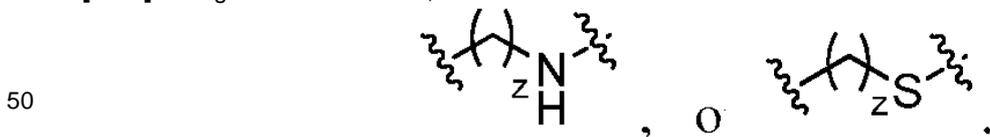
35 **B'** es una cadena lateral que contiene amino o tiol de un aminoácido de **Q**, en la que **B'** es opcionalmente la cadena lateral de un aminoácido correspondiente a la posición 10, 20, 24, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43 de una secuencia que comprende glucagón natural;

L es un enlace,



45 y, x es alquileno C₁-C₁₀ (por ejemplo, alquileno C₁-C₆), alquenileno C₁-C₁₀, o alquinileno C₁-C₁₀.

[0756] En algunas realizaciones, **B'** es



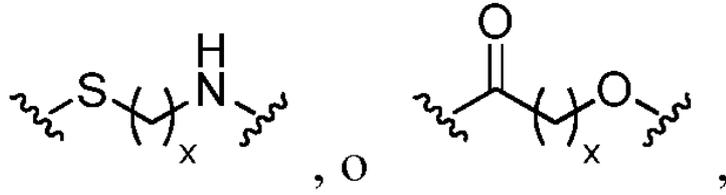
55 En algunas de estas realizaciones, **Z** es alquileno C₁-C₆. Por ejemplo, **B'** puede incluir la cadena lateral de lisina, cisteína, homocisteína, o penicilamina.

[0757] En algunas realizaciones, **L** es un enlace. En otras realizaciones, **L** es



65

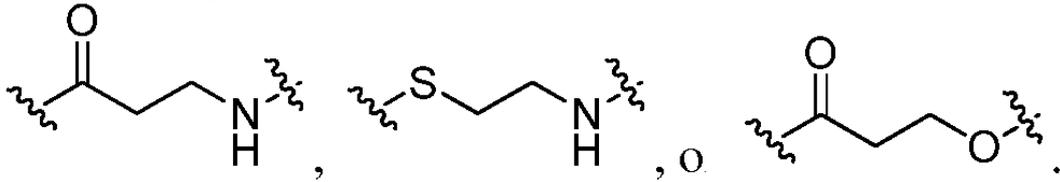
5



10

y x es alquileo C₁-C₅. Por ejemplo, L puede incluir

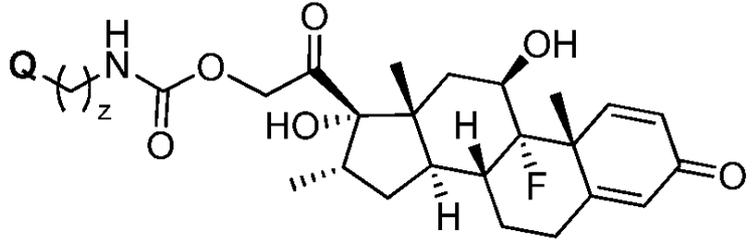
15



20

[0758] En algunas realizaciones, la estructura de Q-L-Y puede ser, por ejemplo:

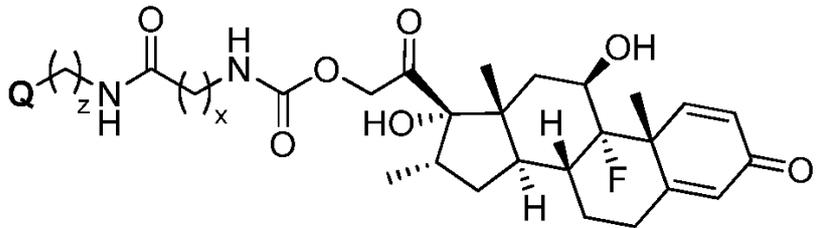
25



30

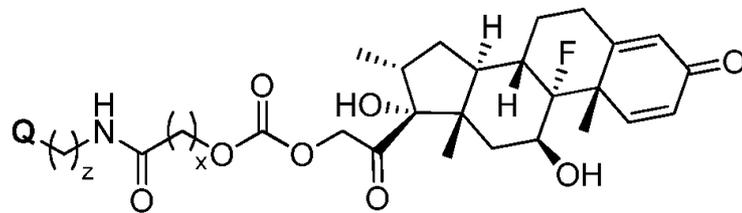
35

40



45

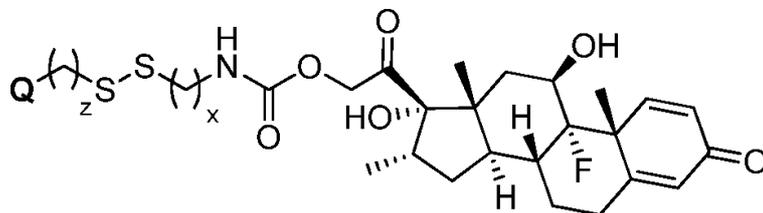
50



55

o

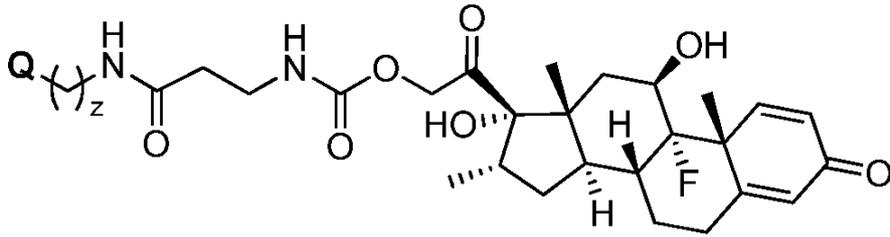
60



65

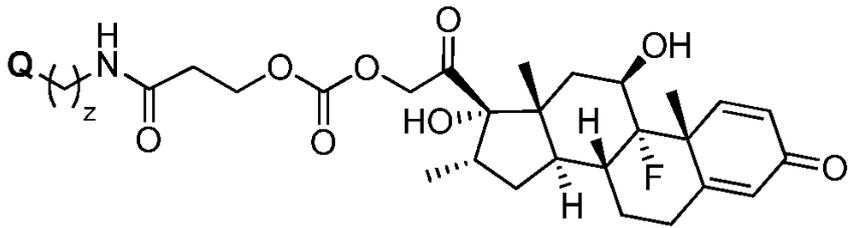
[0759] En algunas de estas realizaciones, X es alqueno C₁-C₄. Por ejemplo, la estructura de Q-L-Y puede incluir:

5



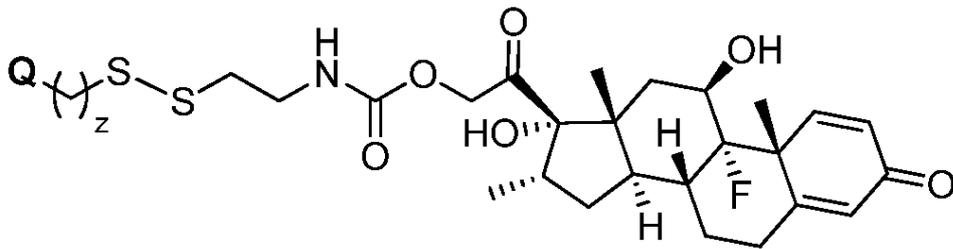
10

15



20

25 o

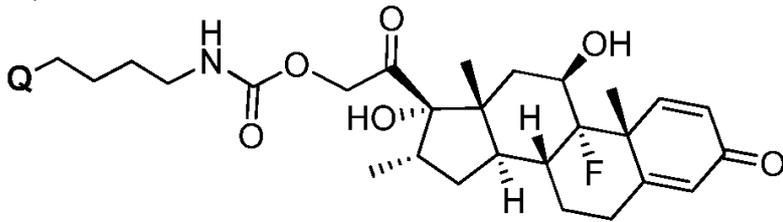


30

35

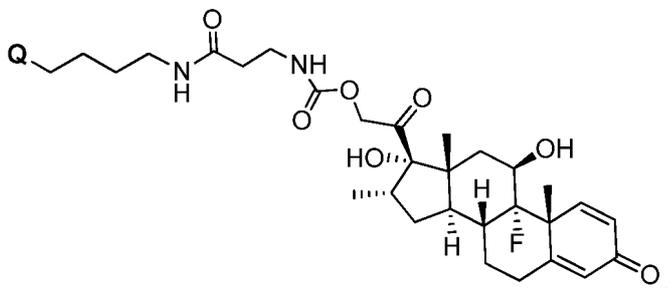
[0760] En algunos ejemplos de realización, la estructura de Q-L-Y es:

40



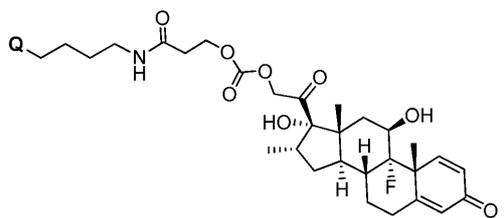
45

50



55

60



65

5

10

15

20

25

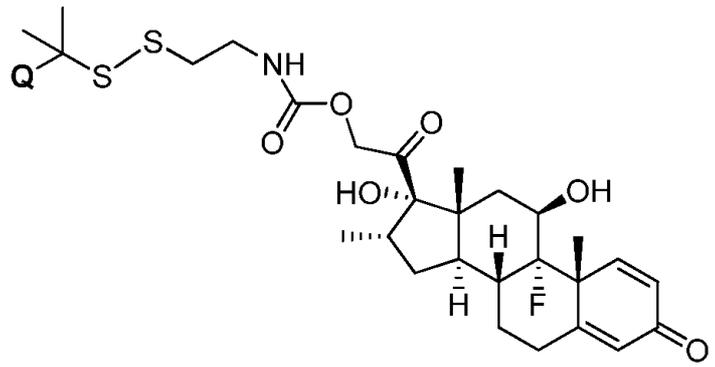
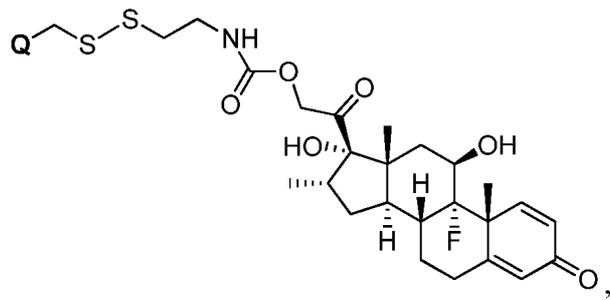
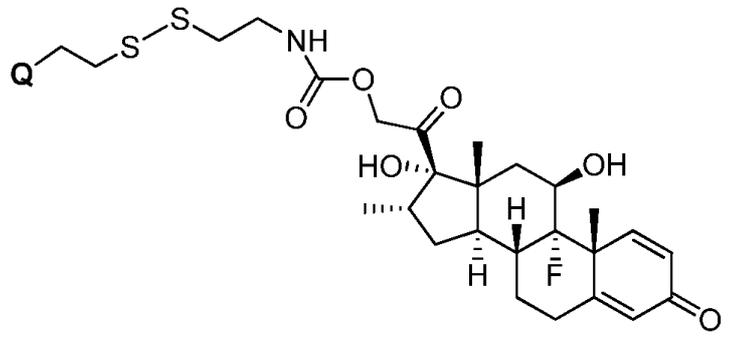
30

35 o

40

45

50

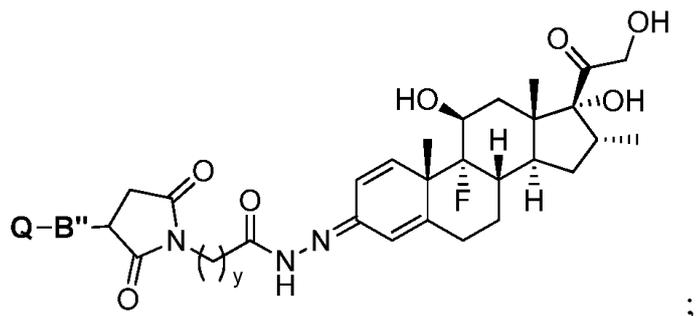


En algunas realizaciones en las que Y es dexametasona, la estructura Q-L-Y puede incluir

55

60

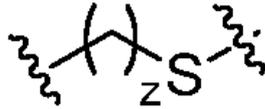
65



en la que

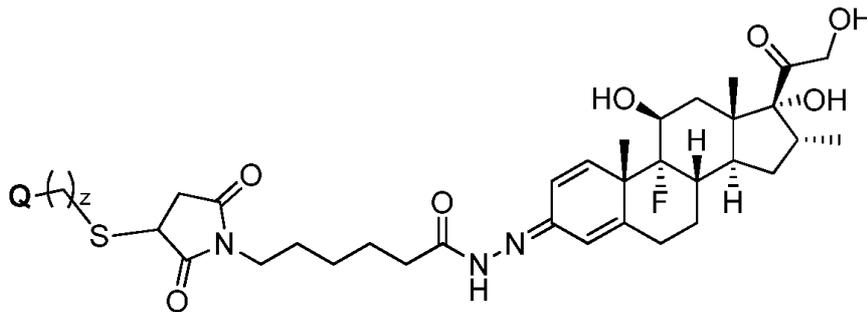
5 **B''** es una cadena lateral que contiene tiol de un aminoácido de **Q**, en la que **B''** es opcionalmente la cadena lateral de un aminoácido correspondiente a la posición 10, 20, 24, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 42, o 43 de una secuencia que comprende glucagón natural, e y es alquileo C₁-C₁₀ (por ejemplo, C₁-C₆), alquilenilo C₁-C₁₀, o alquinileno C₁-C₁₀.

10 **[0761]** En algunas realizaciones, **B''** es

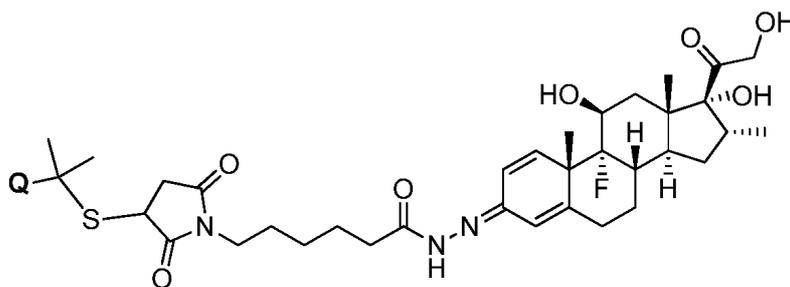
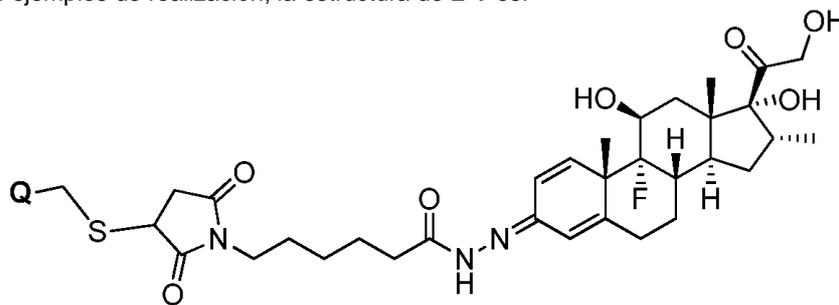


15 En algunas de estas realizaciones, z es alquileo C₁-C₆. Por ejemplo, **B''** puede incluir la cadena lateral de cisteína, homocisteína, o penicilamina.

20 **[0762]** Por ejemplo, la estructura de **Q-L-Y** puede ser



25 **[0763]** En algunos ejemplos de realización, la estructura de **L-Y** es:



30

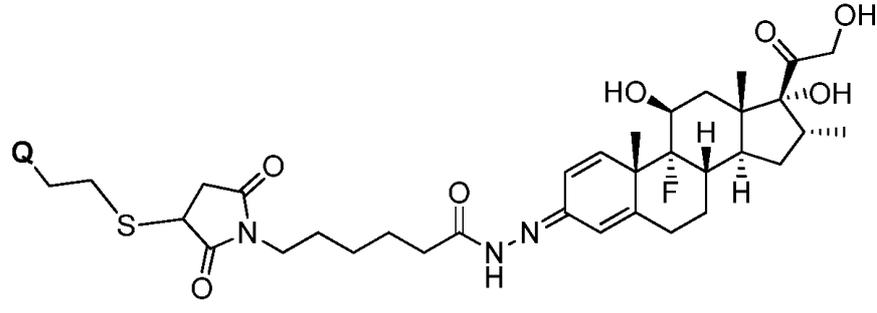
35

40

5

10

15



[0764] Los ejemplos no limitantes de péptidos de la superfamilia del glucagón basados en GLP-1 conjugados con estradiol a través de un enlace estable se muestran a continuación (SEQ ID NOs: 1651-1654, 1667).

20

25

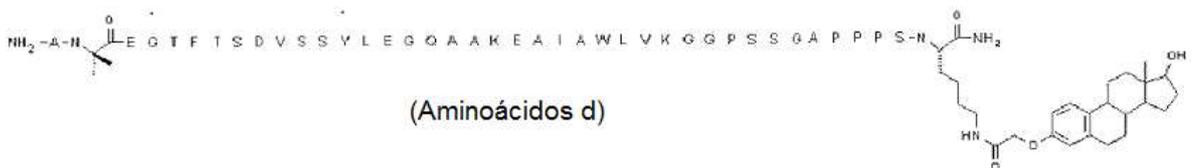


30

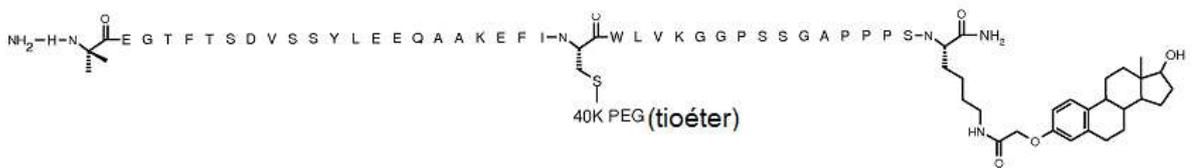


35

40



45



50

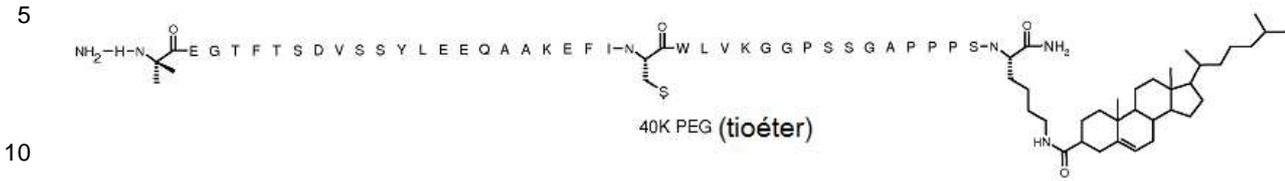
55



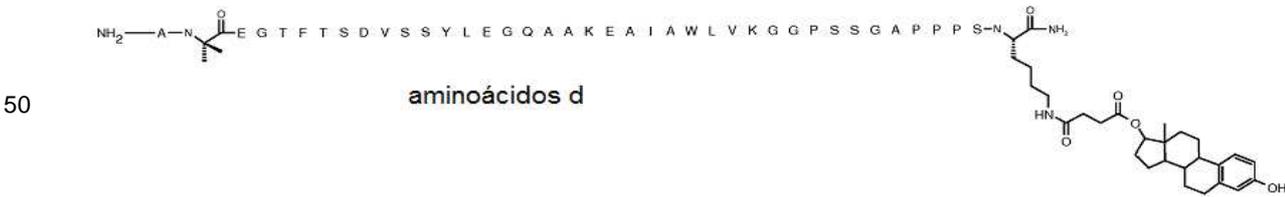
60

[0765] Los ejemplos no limitantes de péptidos de la superfamilia del glucagón basados en GLP-1 conjugados con colesterol a través de un enlace estable se muestran a continuación (SEQ ID NOs.: 1660-1661).

65



[0766] Los ejemplos no limitantes de péptidos de la superfamilia del glucagón basados en GLP-1 conjugados al estradiol o estrona a través de un enlace hidrolizable se muestran a continuación (SEQ ID NOs.: 1655-1659, 1666).



5



15

[0767] Los ejemplos no limitantes de péptidos de la superfamilia del glucagón basados en GLP-1 conjugados a estradiol través de un enlace lábil en medio ácido se muestran a continuación (SEQ ID NO.: 1662).



25

[0768] Los ejemplos no limitantes de péptidos de la superfamilia del glucagón basados en GLP-1 conjugados a estradiol través de un enlace reducción lábil se muestran a continuación (SEQ ID NOS.: 1663-1664).



35



45

[0769] Los ejemplos no limitantes de péptidos de la superfamilia del glucagón basados en GLP-1 conjugados con estradiol a través de un enlace lábil a enzima se muestran a continuación (SEQ ID NOS.: 1665, 1668).



55

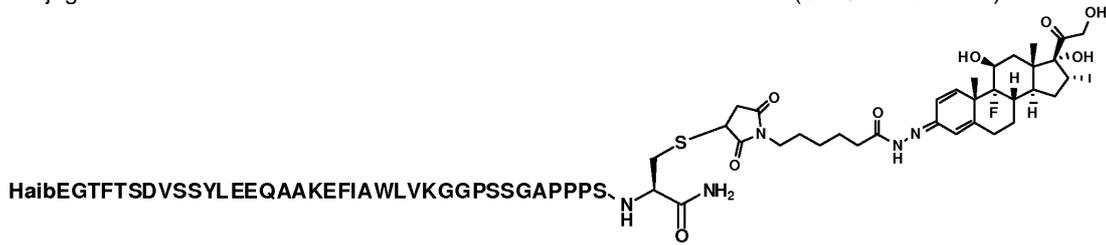


65

[0770] A continuación, se muestra un ejemplo no limitante de un péptido de la superfamilia de glucagón a base de GLP-1 conjugado con dexametasona a través de un enlace lábil en medio ácido (SEQ ID NO: 1669).

5

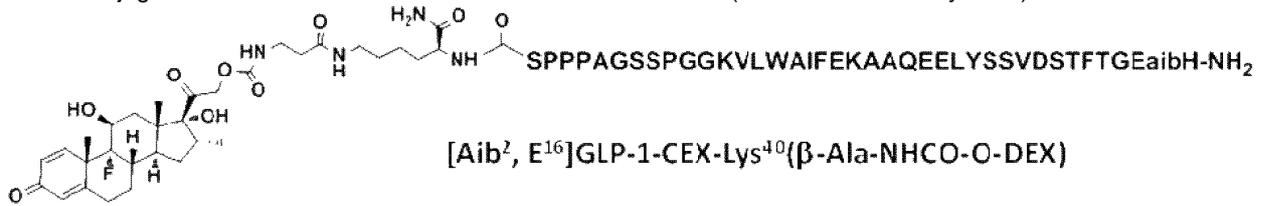
10



[0771] A continuación, se muestran ejemplos no limitantes de un péptido de la superfamilia de glucagón a base de GLP-1 conjugado con dexametasona a través de un enlace estable (SEQ ID NOs: 1670 y 1671).

15

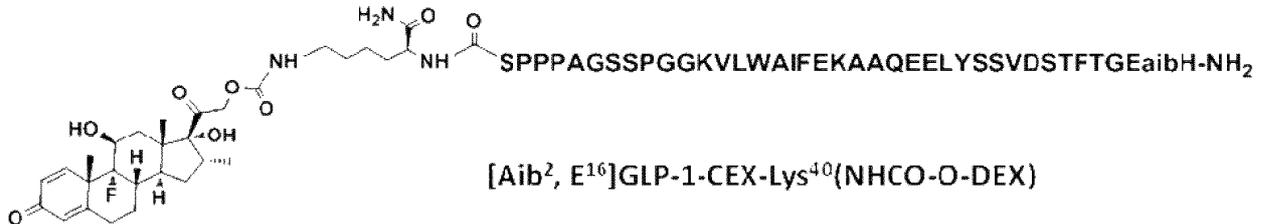
20



25

30

35



40

[0772] A continuación, se muestra un ejemplo no limitante de un péptido de la superfamilia de glucagón a base de GLP-1 conjugado con dexametasona a través de enlaces lábiles a la reducción (SEQ ID NOs: 1672, 1673, y 1674).

45

50

55

60

65

insulina en combinación con una disminución de la masa funcional debido a la apoptosis de las células beta, que surge a partir de la oxidación crónica de glucosa y lípidos (glucolipototoxicidad) junto con hiperfunción compensatoria (estrés ER). Debido a que la diabetes tipo 2 se produce tras la disfunción de las células beta, las estrategias destinadas a proteger a las células beta productoras de insulina de la apoptosis o para restaurar la masa funcional de células beta representan una gran oportunidad para la intervención terapéutica en el tratamiento de la diabetes tipo 2.

[0776] El estrógeno posee robustos efectos anti-apoptóticos en roedores y células beta humanas, así como otros tejidos diana en el cuerpo. Las funciones extra-pancreáticas de estrógeno en el hígado para suprimir la lipogénesis y restaurar la sensibilidad a la insulina pueden mejorar indirectamente la función de las células beta. También tiene acción en el hipotálamo para reducir la ingesta de alimentos y aumentar el gasto de energía. Sin embargo, estos efectos del estrógeno pueden ser perjudiciales en los tejidos diana ginecológicos, como terapia de reemplazo hormonal se ha demostrado que aumenta la incidencia de cáncer de mama. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría en particular, dirigir selectivamente la acción de estrógenos en las células beta, hígado, y/o el hipotálamo puede ser beneficioso.

[0777] La aplicación clínica de estrógenos ha sido limitada debido al temor de su potencial oncogénico y acción ginecológica. Para mejorar el índice terapéutico de los estrógenos, los conjugados basados en incretinas de la descripción permiten el direccionamiento preferencial de los estrógenos en los tejidos deseados y reducir al mínimo la acción en mama y los tejidos del endometrio. Los datos en los ejemplos en el presente documento demuestran que los conjugados de péptidos de la superfamilia del glucagón y los estrógenos tienen un efecto sinérgico, beneficioso sobre el control glucémico (por ejemplo, tal como se mide por los niveles de glucosa disminuidos) y la homeostasis de energía (por ejemplo, tal como se mide por la disminución del peso corporal y/o masa grasa) por las actividades combinadas insulínica y anabólica sobre las células beta pancreáticas con un efecto anorexígeno en el hipotálamo.

[0778] Para explorar la capacidad de cada componente individual del conjugado (por ejemplo, la parte de GLP-1 y la parte de estrógeno) para regular la glucosa en sangre y el peso corporal, se sintetizó un conjunto de conjugados de péptido-estrógeno para poseer un agonismo de GLP-1 completo con un intervalo de menos de 0,1% a más del 100% en la actividad in vitro y con las químicas de enlaces (estables, lábiles, y metaestables) que permiten la liberación de estrógeno diferencial en el plasma. Se determinó la liberación específica de estrógeno para variar dentro de una amplia gama de formas químicas que eran estables a otras formas que liberan totalmente estrógeno en unas pocas horas.

[0779] Por ejemplo, en ratones obesos inducidos por la dieta, un agonista de GLP-1 completamente activo con un estrógeno unido de forma estable demostró consistentemente ser más eficaz en la reducción de la glucosa en sangre y el peso corporal que el control de GLP-1 comparativo. Los conjugados de estrógenos-péptido estables demostraron estar desprovistos de actividad estrogénica clásica tal como se evaluó por la falta de actividad uterotrófica en ratones ovariectomizados, mientras que los conjugados de estrógeno-péptido lábiles muestran actividad trófica en el útero. Los derivados químicos que eliminaron el agonismo de GLP-1 y/o hicieron el estrógeno lábil en plasma demostraron menor eficacia que los conjugados de GLP-1/estrógeno estables, lo que indica que la presencia combinada de GLP-1 y estrógeno dirigidos puede lograr reducciones superiores en glucosa y peso corporal.

[0780] Los conjugados de péptido-estrógeno "meta" estable que se prepararon son estables en plasma pero capaces de liberar estrógeno tras la internalización celular. Estos conjugados de péptido de la superfamilia del glucagón/estrógeno con enlaces metaestables fueron capaces de reducir los niveles de glucosa y el peso corporal en un grado mayor que los conjugados con enlaces lábiles, a la vez que carece de actividad uterotrófica perjudicial.

[0781] Los péptidos de la superfamilia de glucagón que están unidos de forma estable o metaestable a los estrógenos demostraron consistentemente una eficacia mejorada en la reducción de peso corporal, ingesta de alimentos, y la masa grasa en los ratones obesos, no diabéticos, en comparación con un control apropiado. Esta eficacia mejorada está ausente en conjugados donde el estrógeno es farmacológicamente lábil, y no se observa en conjugados donde el péptido de la superfamilia del glucagón es a propósito inactivo. Las uniones estables y metaestables de estrógeno a péptidos de la superfamilia de glucagón estaban diferencialmente desprovistas de actividad estrogénica en relación con los conjugados lábiles y, a diferencia de los conjugados lábiles, no muestran crecimiento uterino. Colectivamente, estos hallazgos demuestran una mayor eficacia derivada de los conjugados de péptido de la superfamilia de glucagón/estrógeno unidos de forma estable y metaestable de la descripción en ratones obesos, metabólicamente comprometidos, sin evidencia del efecto estrogénico clásica que limitan el uso medicinal de los estrógenos.

[0782] En realizaciones de ejemplo, los conjugados son útiles para tratar cualquiera de las condiciones descritas en el presente documento, incluyendo un estado hiperglucémico médica, la obesidad, el síndrome metabólico, y NAFLD.

Composiciones farmacéuticas

Sales

5 **[0783]** En algunas realizaciones, los conjugados **Q-L-Y** descritos en el presente documento están en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Tal como se utiliza en este documento, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de compuestos que retienen la actividad biológica del compuesto parental, y que no son biológicamente o de otra manera indeseables. Dichas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y purificación del análogo, o se pueden preparar por separado mediante reacción de una función de base libre con un ácido adecuado. Muchos de los compuestos descritos en este documento son capaces de formar sales ácidas y/o básicas según la presencia de grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a los mismos.

15 **[0784]** Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales de adición de ácido representativas incluyen acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, benzenosulfonato, bisulfato, butirato, alcanforato, alcanforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico, y similares. 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-tolueno-sulfónico, ácido salicílico, y similares. Ejemplos de ácidos que pueden emplearse para formar sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, un ácido inorgánico, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, y ácido fosfórico, y un ácido orgánico, por ejemplo, ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

30 **[0785]** Las sales de adición de base también se pueden preparar in situ durante el aislamiento final y la purificación de la fuente de ácido salicílico, o haciendo reaccionar un grupo que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoniaco o una amina orgánica primaria, secundaria, o terciaria. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos, tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio, y similares, y amoniaco cuaternario no tóxico y cationes de amina incluyendo amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, trietilamonio, dietilamonio, y etilamonio, entre otros. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina, y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

40 **[0786]** Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno se pueden cuaternizar con el análogo de la presente descripción como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo, y butilo; haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De esta manera, se obtienen productos solubles en agua o solubles en aceite o dispersables.

Formulaciones

50 **[0787]** Según algunas otras realizaciones, se proporciona una composición farmacéutica en la que la composición comprende un conjugado **Q-L-Y** de la presente descripción, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender cualquier ingrediente farmacéuticamente aceptable, incluyendo, por ejemplo, agentes acidificantes, aditivos, adsorbentes, propelentes de aerosoles, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalinizantes, agentes antiapelmazantes, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes de tamponamiento, agentes quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, desecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, disgregantes, dispersantes, agentes potenciadores de disolución, colorantes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de emulsión, cargas, agentes formadores de película, potenciadores del sabor, agentes aromatizantes, potenciadores de flujo, agentes gelificantes, agentes de granulación, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de pomadas, ungüentos, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases de pastillaa, pigmentos, plastificantes, agentes de pulido, conservantes, agentes secuestrantes, agentes de penetración de la piel, agentes solubilizantes, disolventes, agentes estabilizantes, bases de supositorios, agentes activos de superficie, agentes tensioactivos, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes que incrementan la viscosidad, agentes que absorben agua, codisolventes miscibles en agua, ablandadores de agua, o agentes humectantes.

65 **[0788]** En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende uno cualquiera o una combinación de los siguientes componentes: acacia, acesulfamo de potasio, citrato de acetiltributilo, citrato de acetiltriethyl, agar,

albúmina, alcohol, alcohol deshidratado, alcohol desnaturalizado, diluir alcohol, ácido aleurítico, ácido algínico, poliésteres alifáticos, alúmina, hidróxido de aluminio, estearato de aluminio, amilopectina, alfa-amilosa, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, el aspartamo, agua bacteriostática para inyección, bentonita, magma de bentonita, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, bronopol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butilparabeno, sodio butilparabeno, alginato de calcio, ascorbato de calcio, carbonato de calcio, ciclamato de calcio, fosfato de calcio dibásico anhidro, fosfato de calcio dihidrato dibásico, fosfato de calcio tribásico, propionato de calcio, silicato de calcio, sorbato de calcio, estearato de calcio, sulfato de calcio, sulfato de calcio hemihidrato, aceite de maíz, aceite de canola, carbómero, dióxido de carbono, calcio carboximetil celulosa, sodio carboximetil celulosa, beta-caroteno, carragenano, aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado, cera emulsionante catiónico, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, celulosa microcristalina silicificada, la celulosa carboximetil de sodio, alcohol cetosteárico, cetrimida, alcohol cetílico, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, colesterol, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, hidrocloreto de clorhexidina, clorodifluoroetano (HCFC), clorodifluorometano, los clorofluorocarbonos (CFC) clorofenoxietanol, cloroxilenol, sólidos de jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro, monohidrato de ácido cítrico, manteca de cacao, agentes colorantes, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmelosa sódica, crospovidona, ácido ciclámico, ciclodextrinas, dextratos, dextrina, dextrosa, dextrosa anhidra, diazolidinilurea, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, dietanolamina, ftalato de dietilo, difluoroetano (HFC), dimetil-beta-ciclodextrina, compuestos de tipo ciclodextrina tales como Captisol®, éter de dimetilo, ftalato de dimetilo, edetato de dipotasio, edetato de disodio, hidrógeno fosfato de disodio, docusato calcio, docusato potasio, docusato de sodio, galato de dodecilo, bromuro de dodeciltrimetilamonio, edetato de calcio edetato, ácido edtic, eglumine, alcohol etílico, etilcelulosa, galato de etilo, acetato de laurato, maltol etilo, oleato de etilo, etilparabeno, potasio etilparabeno, sodio etilparabeno, etil vainillina, fructosa, líquido de fructosa, fructosa muele, fructosa libre de pirógenos, fructosa en polvo, ácido fumárico, gelatina, glucosa, glucosa líquida, mezclas de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, glicerina, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, autoemulsionante monoestearato de glicerilo, palmitoestearato de glicerilo, glicina, glicoles, glicofuro, goma guar, heptafluoropropano (HFC), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, jarabe alto en fructosa, albúmina de suero humano, hidrocarburos (HC), ácido clorhídrico diluido, aceite vegetal hidrogenado, tipo II, hidroxietil celulosa, hidroxietil-2-beta-ciclodextrina, hidroxipropil celulosa, celulosa de baja sustitución hidroxipropilo, 2-hidroxipropil-beta-ciclodextrina, hidroxipropil metilcelulosa, ftalato de hidroxipropil metilcelulosa, imidurea, índigo carmín, intercambiadores de iones, óxidos de hierro, alcohol isopropílico, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, solución salina isotónica, caolín, ácido láctico, lactitol, lactosa, lanolina, alcoholes de lanolina, lanolina anhidra, lecitina, silicato de aluminio de magnesio, carbonato de magnesio, magnesio normales carbonato, anhidro carbonato de magnesio, hidróxido de carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, lauril sulfato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, trisilicato de magnesio anhidro, ácido málico, malta, maltitol, la solución de maltitol, maltodextrina, maltol, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, meglumina, mentol, metilcelulosa, metacrilato de metilo, oleato de metilo, metilparabeno, el metilparabeno de potasio, metilparabeno de sodio, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa sódica, aceite mineral, aceite mineral ligero, alcoholes de aceite mineral y lanolina, aceite, aceite de oliva, monoetanolamina, montmorillonita, galato de octilo, ácido oleico, ácido palmítico, parafina, aceite de cacahuete, vaselina, vaselina y alcoholes de lanolina, esmalte farmacéutico, fenol, fenol licuado, fenoxietanol, fenoxipropanol, alcohol feniletílico, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, polacrilina, polacrilina de potasio, poloxámero, polidextrosa, polietilenglicol, óxido de polietileno, poliácridatos, polímeros de polietileno-polioxipropileno de bloques, polimetacrilatos, éteres de alquilo de polioxietileno, derivados de aceite de ricino de polioxietileno, ésteres de ácido grasos sorbitol de polioxietileno, estearatos de polioxietileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, alginato de potasio, benzoato de potasio, bicarbonato de potasio, bisulfito de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, citrato de potasio anhidro, hidrógeno fosfato de potasio, metabisulfito de potasio, fosfato de potasio monobásico, propionato de potasio, sorbato de potasio, povidona, propanol, ácido propiónico, carbonato de propileno, glicol de propileno, alginato de propilenglicol, galato de propilo, propilparabeno, potasio propilparabeno, coloidal de sodio propilparabeno, sulfato de protamina, aceite de colza, solución de Ringer, sacarina, sacarina de amonio, sacarina de calcio, sacarina de sodio, aceite de cártamo, saponita, proteínas de suero, aceite de sésamo, sílice coloidal, dióxido de silicio, alginato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bicarbonato de sodio, bisulfito de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio anhidro, dihidrato de citrato de sodio, cloruro de sodio, ciclamato de sodio, edetato de sodio, dodecil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sodio fosfato dibásico, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio, tribásico, propionato de sodio anhidro, propionato de sodio, sorbato de sodio, almidón glicolato de sodio, estearil fumarato de sodio, sulfito de sodio, ácido sórbico, ésteres de sorbitán (ésteres grasos de sorbitán), sorbitol, solución de sorbitol 70%, aceite de soja, cera de esperma de ballena, almidón, almidón de maíz, almidón de patata, almidón pregelatinizado, almidón de maíz esterilizable, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, alcohol esteárico, sacarosa, azúcares, azúcar compresible, azúcar de confitería, esferas de azúcar, azúcar invertido, Sugartab, amarillo ocaso FCF, parafina sintética, talco, ácido tartárico, tartrazina, tetrafluoroetano (HFC), aceite de Theobroma, timerosal, dióxido de titanio, alfa tocoferol, acetato de tocoferol, alfa tocoferol succinato ácido, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma tocoferol, tragacanto, triacetina, citrato de tributilo, trietanolamina, citrato de trietilo, trimetil-beta-ciclodextrina, bromuro de trimetiltetradecilamonio, tampón tris, edetato trisódico, vainillina, aceite vegetal hidrogenado tipo I, agua, agua blanda, agua dura, agua libre de dióxido de carbono, agua libre de pirógenos, agua para inyección, agua estéril para inhalación, agua estéril para inyección, agua estéril para irrigación, ceras, cera emulsionante aniónica, cera de carnauba, cera emulsionante catiónica, cera de éster cetílico, cera microcristalina, cera emulsionante no iónica, cera de supositorio, cera blanca, cera amarilla, vaselina blanca,

grasa de lana, goma de xantano, xilitol, zeína, propionato de zinc, sales de zinc, estearato de zinc, o cualquier excipiente en el Handbook of Pharmaceutical Excipients, Tercera Edición, AH Kibbe (Pharmaceutical Press, Londres, Reino Unido, 2000), que se incorpora por referencia en su totalidad. Remington Pharmaceutical Sciences, Decimosexta Edición, EW Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), describe diversos componentes utilizados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de los mismos. Excepto en la medida que cualquier agente convencional sea incompatible con las composiciones farmacéuticas, se contempla su uso en composiciones farmacéuticas. Los principios activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

[0789] En algunas realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, al menos A, en donde A es 0,0001% p/v, 0,001% p/v, 0,01 % p/v, 0,1% p/v, 1% p/v, 2% p/v, 5% p/v, 10% p/v, 20% p/v, 30% p/v, 40% p/v, 50% p/v, 60% p/v, 70% p/v, 80% p/v, o 90% p/v. En algunas realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, como máximo B, donde B es 90% p/v, 80% p/v, 70% p/v, 60% p/v, 50% p/v, 40% p/v, 30% p/v, 20% p/v, 10% p/v, 5% p/v, 2% p/v, 1% p/v, 0,1% p/v, 0,001% p/v, o 0,0001%. En otras realizaciones, el componente o componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier intervalo de concentración, tal como, por ejemplo, de aproximadamente A a aproximadamente B. En algunas realizaciones, A es 0,0001% y B es 90%.

[0790] Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica puede ser de al menos 5, al menos 5,5, al menos 6, al menos 6,5, al menos 7, al menos 7,5, al menos 8, al menos 8,5, al menos 9, al menos 9,5, al menos 10, o al menos 10,5 hasta e incluyendo pH 11, dependiendo de la formulación y vía de administración. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes de tamponamiento para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. Los agentes tampón pueden incluir cualquier compuestos capaces de tamponamiento al pH deseado, tal como, por ejemplo, tampones de fosfato (por ejemplo, PBS), trietanolamina, tris, bicina, TAPS, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES, y otros. En ciertas realizaciones, la fuerza del tampón es de al menos 0,5 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 30 mM, al menos 40 mM, al menos 50 mM, al menos 60 mM, al menos 70 mM, al menos 80 mM, al menos 90 mM, al menos 100 mM, al menos 120 mM, al menos 150 mM, o al menos 200 mM. En algunas realizaciones, la fuerza de la memoria intermedia no es mayor de 300 mM (por ejemplo, como máximo 200 mM, como máximo 100 mM, como máximo 90 mM, como máximo 80 mM, como máximo 70 mM, como máximo 60 mM, como máximo 50 mM, como máximo 40 mM, como máximo 30 mM, como máximo 20 mM, como máximo 10 mM, como máximo 5 mM, como máximo 1 mM).

35 Rutas de administración

[0791] La siguiente discusión sobre rutas de administración se proporciona simplemente para ilustrar otras realizaciones de ejemplo y no debe interpretarse como limitantes del alcance de ninguna manera.

[0792] Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del análogo de la presente descripción disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina, o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas, y trociscos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, y los alcoholes de polietileno, ya sea con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina de cubierta dura o blanda ordinaria que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tamponantes, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastillas pueden comprender el análogo de la presente descripción en un sabor, habitualmente sacarosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el análogo de la presente descripción en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia, emulsiones, geles, y similares que contienen, además, excipientes tal como son conocidos en la técnica.

[0793] Los conjugados de la descripción, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden liberar a través de la administración pulmonar y se pueden disponer en formulaciones en aerosol para ser administrado vía inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o un atomizador. Dichas formulaciones de aerosol se pueden usar también para rociar la mucosa. En algunas realizaciones, el análogo se formula en una mezcla en polvo o en micropartículas o nanopartículas. Las formulaciones pulmonares adecuadas son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Qian et al, Int J Pharm 366: 218-220 (2009); Adjei y Garren, Pharmaceutical Research, 7 (6): 565-569 (1990); Kawashima et al, J Controlled Release 62 (1-2): 279-287 (1999);

Liu et al, Pharm Res 10 (2): 228-232 (1993); Publicaciones de la solicitud de Patente Internacional Nos. WO 2007/133747 y WO 2007/141411.

[0794] Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones isotónicas estériles de inyección, acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas al que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, y conservantes. El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra vía tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa. El análogo de la presente descripción se puede administrar con un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol o alcohol de hexadecilo, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales, tales como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácido graso o glicéridos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tales como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

[0795] Los aceites, que se pueden utilizar en formulaciones parenterales incluyen petróleo, aceites animales, vegetales, o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen de cacahuete, soja, sésamo, semilla de algodón, maíz, oliva, vaselina, y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico, y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

[0796] Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metal alcalino, amonio, y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetil dialquil amonio, y haluros de alquil piridinio, (b) detergentes aniónicos, tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo, y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos, tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros, tales como, por ejemplo, alquil- β -aminopropionatos, y sales de amonio cuaternario de 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de los mismos.

[0797] Las formulaciones parenterales contendrán típicamente de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 25% en peso de conjugado **Q-L-Y** de la presente descripción en solución. Se pueden usar conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, dichas composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en dichas formulaciones normalmente variará de aproximadamente 5% a aproximadamente 15% en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol sorbitán, tales como monooleato de sorbitán y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrofóbica, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o de múltiples dosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en un estado liofilizado que requiere sólo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

[0798] Las formulaciones inyectables están de acuerdo con la descripción. Los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son bien conocidos para los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238-250 (1982) y el *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622-630 (1986)).

[0799] Además, el conjugado de la presente descripción se puede disponer en supositorios para la administración rectal mediante la mezcla con una variedad de bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas, o fórmulas de pulverización que contienen, además del principio activo, portadores tales como se conocen en la técnica como apropiados.

[0800] Se entenderá por un experto en la técnica que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, el conjugado de la divulgación se puede formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas.

Dosis

[0801] Los conjugados **Q-L-Y** de la divulgación se cree que son útiles en procedimientos de tratamiento de una enfermedad o condición médica en la que el agonismo del receptor de glucagón, el agonismo del receptor de GLP-1, el agonismo del receptor de GIP, el coagonismo de receptor de glucagón/GLP-1, el coagonismo de receptor de glucagón/GIP, el coagonismo de receptor de GLP-1/receptor de GIP o triagonismo de receptor de glucagón/receptor

de GLP-1/receptor de GIP juega un papel. Para los fines de la descripción, la cantidad o dosis del conjugado de la presente descripción administrada debe ser suficiente para efectuar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un intervalo de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del conjugado de la presente descripción debe ser suficiente para estimular la secreción de AMPc de células tal como se describen en el presente documento o suficiente para disminuir los niveles de glucosa en sangre, los niveles de grasa, los niveles de ingesta de alimentos, o el peso corporal de un mamífero, en un período de de aproximadamente 1 a 4 minutos, de 1 a 4 horas o 1 a 4 semanas o más largo, por ejemplo, de 5 a 20 o más semanas, desde el momento de la administración. En realizaciones de ejemplo, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis se determinará por la eficacia del conjugado particular de la presente descripción y la afección del animal (por ejemplo, humano), así como el peso corporal del animal (por ejemplo, humano) a tratar.

[0802] En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. Para propósitos de este documento, un ensayo, que comprende la comparación de la medida en que se reducen los niveles de glucosa en sangre tras la administración de una dosis dada del conjugado de la presente descripción a un mamífero entre un conjunto de mamíferos de los cuales está cada dado una dosis diferente de la conjugado, se podría utilizar para determinar una dosis de partida para ser administrado a un mamífero. La medida en que los niveles de glucosa en sangre se reducen tras la administración de una cierta dosis puede ensayarse por procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los procedimientos descritos en el presente documento en la sección de Ejemplos.

[0803] La dosis del conjugado de la presente descripción también estará determinada por la existencia, naturaleza y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que pudieran acompañar a la administración de un conjugado particular de la presente divulgación. Típicamente, el médico que atiende decidirá la dosis del conjugado de la presente descripción con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en cuenta una variedad de factores, tales como edad, peso corporal, salud general, dieta, el sexo, el conjugado de la presente divulgación a ser administrado, la vía de administración, y la gravedad de la afección a tratar. A modo de ejemplo y no se pretende limitar la divulgación, la dosis del conjugado de la presente descripción puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal del sujeto que está siendo tratado/día, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,001 g/kg de peso corporal/día, o aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 g/kg de peso corporal/día.

[0804] En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende cualquiera de los conjugados descritos en el presente documento en un nivel de pureza adecuado para la administración a un paciente. En algunas realizaciones, el análogo tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 90%, aproximadamente el 91%, aproximadamente el 92%, aproximadamente el 93%, aproximadamente el 94%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 96%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 98% o aproximadamente el 99%, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica en algunos aspectos comprende el análogo de la presente descripción a una concentración de al menos A, en la que A es de aproximadamente 0,001 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml, 0 aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml o mayor. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende el análogo a una concentración de como máximo B, en la que B es aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 23, mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, o aproximadamente 0,1 mg/ml. En algunas realizaciones, las composiciones pueden contener un conjugado a un intervalo de concentración de A a B mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 30,0 mg/ml.

Formas dirigidas

[0805] Un experto en la técnica apreciarán fácilmente que los conjugados **Q-L-Y** de la divulgación pueden modificarse en cualquier número de formas, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica del conjugado de las presentes revelaciones se incrementa a través de la modificación. Por ejemplo, el conjugado de la presente descripción se puede conjugar directa o indirectamente a través de un enlazador a un grupo de reconocimiento. La práctica de la conjugación de compuestos, por ejemplo, conjugados de glucagón descritos en el presente documento, a grupos de reconocimiento se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadhwa et al., J Drug Targeting 3, 111-127 (1995) y la patente de Estados Unidos N° 5.087.616. El término "grupo de reconocimiento", tal como se utiliza en este documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une

a un receptor de superficie celular, de manera que el grupo de reconocimiento dirige la liberación del conjugado de la presente descripción a una población de células en cuya superficie se expresa el receptor (el receptor de glucagón, el receptor de GLP-1). Los grupos de reconocimiento incluyen anticuerpos, o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, y otros ligandos naturales o no naturales, que se unen a receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de células T (TCR), receptor de células B (BCR), CD28, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de acetilcolina nicotínico (nAChR), etc.). Tal como se utiliza en el presente documento un "enlazador" es un enlace, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los enlazadores pueden proporcionar el espaciado óptimo de las dos entidades, o pueden suministrar adicionalmente un enlace lábil que permite que las dos entidades se separen entre sí. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, grupos lábiles en medio ácido, grupos lábiles en medio básico y grupos escindibles por enzimas. El término "enlazador" en algunas realizaciones se refiere a cualquier agente o molécula que une el conjugado de la presente descripción al grupo de reconocimiento. Un experto en la técnica reconoce que los sitios en el conjugado de la presente descripción, que no son necesarios para la función del conjugado de la presente descripción, son lugares ideales para la unión de un enlazador y/o un grupo de reconocimiento, siempre que el enlazador y/o grupo de reconocimiento, una vez unidos al conjugado de la presente descripción, no interfieren con la función del conjugado de la presente descripción, es decir, la capacidad de estimular la secreción de AMPc de las células, para tratar la diabetes o la obesidad. Un experto en la técnica reconoce que los sitios en el péptido de la presente divulgación (Q), que no son necesarios para la función del péptido de la presente divulgación (por ejemplo, péptido agonista de glucagón, péptido antagonista de glucagón, péptido agonista de GLP-1, péptido agonista de GIP, o una combinación de cualquiera de los anteriores), son sitios ideales para unir un enlazador y/o un resto de dirección, siempre que el resto enlazador y/o la orientación, una vez unido al péptido de la presente divulgación (Q), no interfiere con la función del péptido de la presente divulgación.

25 Formulaciones de liberación controlada

[0806] Alternativamente, los conjugados de glucagón descritos en este documento pueden modificarse en una forma de depósito, de manera que la forma en que el conjugado de la presente descripción se libera en el organismo al que se administra está controlado con respecto al tiempo y la ubicación dentro de la cuerpo (véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.450.150). Las formas de depósito del conjugado de la presente descripción pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende el conjugado de la presente descripción y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, en el que el conjugado de la presente descripción es encapsulado por o difundido por todo el material y/o la degradación del material no poroso. El depósito se implanta entonces en la ubicación deseada dentro del cuerpo y el conjugado de la presente descripción se libera desde el implante a una velocidad predeterminada.

[0807] La composición farmacéutica en aspectos de ejemplo se modifica para tener cualquier tipo de perfil de liberación in vivo. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación de liberación inmediata, liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación retardada, o de liberación bifásica. Los procedimientos de formulación de péptidos para la liberación controlada son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Qian et al, J Pharm 374: 46-52 (2009) y las publicaciones de solicitud de Patente Internacional N° WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; y WO 1999/040942.

[0808] 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 almacenamiento prolongado y/o efecto de liberación prolongado. Las formulaciones farmacéuticas descritas se pueden administrar según cualquier régimen incluyendo, por ejemplo, todos los días (1 vez por día, 2 veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día, 5 veces al día, 6 veces por día), tres veces por semana, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, semanal, quincenal, cada tres semanas, mensual o bimensual.

50 Usos

[0809] Sobre la base de la información proporcionada por primera vez en el presente documento, se contempla que los conjugados Q-L-Y descritos aquí y composiciones farmacéuticas relacionadas, son útiles para el tratamiento de una enfermedad o condición médica, en la que por ejemplo, la falta de actividad en el receptor de GIP, el receptor de GLP-1, o en ambos receptores, es un factor en la aparición y/o progresión de la enfermedad o afección médica. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica en un paciente, donde la enfermedad o afección médica es una enfermedad o afección médica en la que la falta de activación del receptor de GIP y/o activación del receptor de GLP-1 están asociados con la aparición y/o progresión de la enfermedad o la afección médica. El procedimiento comprende proporcionar al paciente una composición o conjugado de acuerdo con cualquiera de los descritos en este documento en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección médica.

[0810] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección médica es el síndrome metabólico. El síndrome metabólico, también conocido como síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome de Reaven, es un trastorno que afecta a más de 50 millones de estadounidenses. El síndrome metabólico se

caracteriza típicamente por una agrupación de al menos tres o más de los siguientes factores de riesgo: (1) la obesidad abdominal (tejido graso excesivo en y alrededor del abdomen), (2) la dislipidemia aterogénica (trastornos de grasa en la sangre incluyendo niveles altos de triglicéridos, bajo colesterol HDL y alto colesterol LDL que aumentan la acumulación de placa en las paredes de las arterias), (3) la presión arterial elevada, (4) resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, (5) estado protrombótico (por ejemplo, alto fibrinógeno o inhibidor-1 del activador de plasminógeno en sangre), y (6) estado proinflamatorio (por ejemplo, la proteína C reactiva elevada en la sangre). Otros factores de riesgo pueden incluir el envejecimiento, desequilibrio hormonal y la predisposición genética.

[0811] El síndrome metabólico se asocia con un aumento en el riesgo de enfermedad coronaria y otros trastornos relacionados con la acumulación de placa vascular, tal como un accidente cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, que se refiere como enfermedades cardiovascular aterosclerótica (ASCVD). Los pacientes con síndrome metabólico pueden pasar de un estado de resistencia a la insulina en sus primeras etapas a diabetes de tipo II total con mayor riesgo de ASCVD. Sin pretender estar ligado por ninguna teoría en particular, la relación entre la resistencia a la insulina, el síndrome metabólico y la enfermedad vascular puede implicar uno o más mecanismos patogénicos simultáneos, incluyendo alteración de la vasodilatación estimulada por la insulina, la reducción asociada con la resistencia a la insulina en la disponibilidad de NO debido al aumento del estrés oxidativo, y anormalidades en las hormonas derivada de adipocitos, tales como la adiponectina (Lteif y Mather, Can J. Cardiol 20 (supl B): 66B-76B (2004)).

[0812] Según el Panel de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación de Colesterol Nacional (ATP III) del 2001, cualquiera de tres de las siguientes características en el mismo individuo cumplen los criterios de síndrome metabólico: (a) la obesidad abdominal (circunferencia de cintura de más de 102 cm en los hombres y más de 88 cm en las mujeres); (b) los triglicéridos séricos (150 mg/dl o superior); (c) el colesterol HDL (40 mg/dl o más bajo en los hombres y 50 mg/dl o menor en las mujeres); (d) la presión arterial (130/85 o más); y (e) de glucosa en sangre en ayunas (110 mg/dl o superior). Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), un individuo que tiene niveles altos de insulina (una glucemia en ayunas elevada o una glucosa sola después de comida) con al menos dos de los siguientes criterios cumple con los criterios de síndrome metabólico: (a) la obesidad abdominal (relación cintura a cadera superior a 0,9, un índice de masa corporal de al menos 30 kg/m², o una medida de cintura de más de 37 pulgadas); (b) panel de colesterol que muestra un nivel de triglicéridos de al menos 150 mg/dl o un colesterol HDL menor que 35 mg/dl; (c) la presión arterial de 140/90 o más, o en tratamiento para la presión arterial alta). (Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome", ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, 11 de mayo de 2009).

[0813] Para los propósitos de este documento, si una persona cumple con los criterios de uno o ambos de los criterios establecidos por el Panel de Tratamiento de Adultos del Programa de Educación de Colesterol Nacional o la OMS, ese individuo es considerado como afectado por el síndrome metabólico.

[0814] Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los conjugados **Q-L-Y** descritos en este documento son útiles para tratar el síndrome metabólico. Por consiguiente, la descripción proporciona un procedimiento para prevenir o tratar el síndrome metabólico, o la reducción de uno, dos, tres o más factores de riesgo de los mismos, en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una composición descrita en el presente documento en una cantidad eficaz para prevenir o tratar el síndrome metabólico, o el factor de riesgo de los mismos.

[0815] En algunas realizaciones, el procedimiento trata una afección médica hiperglucémica. En aspectos de ejemplo, la afección médica hiperglucémica es diabetes, diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, o diabetes gestacional, ya sea dependiente de insulina o no dependiente de insulina. En algunos aspectos, el procedimiento trata la afección médica hiperglucémica mediante la reducción de una o más complicaciones de la diabetes, incluyendo la nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

[0816] En algunos aspectos, la enfermedad o afección médica es la obesidad. En algunos aspectos, la obesidad es la obesidad inducida por fármacos. En algunos aspectos, el procedimiento trata la obesidad mediante la prevención o la reducción de la ganancia de peso o el aumento de la pérdida de peso en el paciente. En algunos aspectos, el procedimiento trata la obesidad mediante la reducción del apetito, la disminución de la ingesta de alimentos, la reducción de los niveles de grasa en el paciente, o la disminución de la velocidad de movimiento de los alimentos a través del sistema gastrointestinal.

[0817] Debido a que la obesidad está asociada con la aparición o progresión de otras enfermedades, los procedimientos de tratamiento de la obesidad son además útiles en los procedimientos de reducción de complicaciones asociadas con la obesidad, incluyendo la enfermedad vascular (enfermedad de la arteria coronaria, accidente cerebrovascular, enfermedad vascular periférica, la reperfusión de isquemia, etc.), la hipertensión, la aparición de la diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas. Por consiguiente, la presente descripción proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de estas complicaciones asociadas a la obesidad.

[0818] En algunas realizaciones, la enfermedad o afección médica es una enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD). La NAFLD se refiere a un amplio espectro de enfermedad hepática que va desde el hígado graso simple (esteatosis), a la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), a cirrosis (cicatrización irreversible avanzada del hígado).

Todas las etapas de NAFLD tienen en común la acumulación de grasa (infiltración grasa) en las células hepáticas (hepatocitos). El hígado graso simple es la acumulación anormal de un cierto tipo de grasa, triglicéridos, en las células hepáticas con ninguna inflamación o cicatrización. En NASH, la acumulación de grasa se asocia con grados variables de inflamación (hepatitis) y la cicatrización (fibrosis) del hígado. Las células inflamatorias pueden destruir las células del hígado (necrosis hepatocelular). En los términos "esteatohepatitis" y "esteatonecrosis", esteato se refiere a la infiltración de grasa, hepatitis refiere a la inflamación en el hígado, y la necrosis se refiere a las células hepáticas destruidas. NASH en última instancia puede conducir a la cicatrización del hígado (fibrosis) y a continuación la cicatrización avanzada irreversible (cirrosis). La cirrosis causada por NASH es la última etapa y la más grave en el espectro de NAFLD (Mendler, Michel, "Fatty liver: nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) and nonalcoholic steatohepatitis (NASH)," ed Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com 29 de agosto, 2005.).

[0819] La enfermedad hepática alcohólica, o enfermedad hepática inducida por el alcohol abarca tres enfermedades hepáticas patológicamente distintas relacionadas o causadas por el consumo excesivo de alcohol: hígado graso (esteatosis), hepatitis crónica o aguda, y la cirrosis. La hepatitis alcohólica puede ir desde una hepatitis leve, con pruebas anormales de laboratorio siendo la única indicación de enfermedad, disfunción hepática severa con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla causada por la retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica causada por insuficiencia hepática), ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), varices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación anormal de la sangre y coma. Histológicamente, la hepatitis alcohólica tiene un aspecto característico, con degeneración globular de los hepatocitos, inflamación con neutrófilos y, a veces cuerpos de Mallory (agregaciones anormales de proteínas de filamentos intermedios celulares). La cirrosis se caracteriza anatómicamente por nódulos generalizados en el hígado combinados con fibrosis. (Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", sitio web de la Universidad de Columbia Medical Center).

[0820] Sin estar ligado a ninguna teoría particular, los conjugados **Q-L-Y** descritos en este documento son útiles para el tratamiento de la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD, o en cualquier etapa de la misma, incluyendo, por ejemplo, esteatosis, esteatohepatitis, hepatitis, inflamación hepática, NASH, cirrosis, o sus complicaciones. Por consiguiente, la presente descripción proporciona un procedimiento para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, hígado graso no alcohólico, o en cualquier etapa del mismo, en un sujeto que comprende administrar a un sujeto una composición descrita en el presente documento en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD, o la etapa de los mismos. Tales procedimientos de tratamiento incluyen la reducción en uno, dos, tres o más de los siguientes: contenido de grasa en el hígado, la incidencia o la progresión de la cirrosis, la incidencia de carcinoma hepatocelular, los signos de inflamación, por ejemplo, niveles anormales de enzimas hepáticas (por ejemplo, aspartato aminotransferasa AST y/o alanina aminotransferasa ALT o LDH), la ferritina sérica elevada, bilirrubina sérica elevada y/o signos de fibrosis, por ejemplo, los niveles elevados de TGF-beta. En realizaciones preferidas, los conjugados **Q-L-Y** descritos en el presente documento se utilizan para tratar a los pacientes que han progresado más allá de hígado graso simple (esteatosis) y muestran signos de inflamación o hepatitis. Dichos procedimientos pueden dar lugar, por ejemplo, a la reducción de AST y/o los niveles de ALT.

[0821] GLP-1 y exendina-4 han demostrado tener algún efecto neuroprotector. La descripción también proporciona usos de los conjugados **Q-L-Y** descritos en el presente documento en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amiotrófica, otros trastornos relacionados con desmielinización, demencia senil, demencia subcortical, demencia arteriosclerótica, demencia asociada al SIDA, u otras demencias, un cáncer del sistema nervioso central, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, apoplejía o isquemia cerebral, la vasculitis cerebral, la epilepsia, la enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, síndrome de Guillain Barre, la enfermedad de Wilson, enfermedad de Pick, trastornos neuroinflamatorios, encefalitis, encefalomiелitis o meningitis del virus, hongos u origen bacteriano, u otras infecciones del sistema nervioso central, enfermedades priónicas, las ataxias cerebelosas, la degeneración cerebelosa, síndromes de degeneración espinocerebelosa, ataxia de Friedreichs, ataxia telangiectasia, dismiotrofia espinal, parálisis supranuclear progresiva, distonía, espasticidad muscular, temblor, retinitis pigmentosa, degeneración estriatonigral, encefalomiopatías mitocondriales, lipofuscinosis ceroides neuronal, encefalopatías hepáticas, encefalopatías renales, encefalopatías metabólicas, encefalopatías inducidas por toxinas, y daño cerebral inducido por la radiación.

[0822] En algunas realizaciones, la enfermedad o condición médica es la hipoglucemia. En algunas realizaciones, el paciente es un paciente diabético y la hipoglucemia es inducida por la administración de insulina. En aspectos específicos, el procedimiento comprende proporcionar el conjugado de la presente descripción en combinación con insulina de modo que el conjugado amortigua los efectos hipoglucemiantes de la administración en bolo de insulina.

[0823] En algunas realizaciones, los conjugados **Q-L-Y** se usan junto con la administración parenteral de nutrientes a pacientes no diabéticos en un entorno hospitalario, por ejemplo, a pacientes que reciben nutrición parenteral o nutrición parenteral total. Ejemplos no limitantes incluyen pacientes quirúrgicos, pacientes en coma, pacientes con enfermedad del tracto digestivo o un tracto gastrointestinal no funcional (por ejemplo, debido a extirpación quirúrgica, bloqueo o capacidad de absorción alterada, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, obstrucción del tracto gastrointestinal, fistula del tracto gastrointestinal, pancreatitis aguda, intestino isquémico, cirugía gastrointestinal importante, ciertas anomalías congénitas del tracto gastrointestinal, diarrea prolongada o síndrome del intestino

corto debido a la cirugía, pacientes en estado de shock y pacientes sometidos a procesos de curación a menudo reciben administración parenteral de carbohidratos junto con varias combinaciones de lípidos, electrolitos y minerales, vitaminas y aminoácidos. Los conjugados **Q-L-Y** y la composición nutricional parenteral se pueden administrar al mismo tiempo, en diferentes momentos, antes o después uno del otro, siempre que el conjugado **Q-L-Y** esté ejerciendo el efecto biológico deseado en el momento en que el medicamento parenteral composición nutricional que se digiere. Por ejemplo, la nutrición parenteral puede administrarse 1, 2 o 3 veces por día, mientras que el conjugado de glucagón se administra una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas, o una vez al mes.

[0824] Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar" y "prevenir", así como palabras procedentes de las mismas, no implican necesariamente 100% o tratamiento o prevención completa. Más bien, hay diferentes grados de tratamiento o prevención de que un experto ordinario hi la técnica reconoce como tener un beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los procedimientos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de una enfermedad o condición médica en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionada por el procedimiento pueden incluir el tratamiento o la prevención de una o más condiciones o síntomas de la enfermedad o condición médica. Por ejemplo, con respecto a los procedimientos de tratamiento de la obesidad, el procedimiento en algunas realizaciones, se consigue una disminución en la ingesta de alimentos por o los niveles de grasa en un paciente. También, para los propósitos del presente documento, "prevención" puede abarcar retrasar la aparición de la enfermedad, o un síntoma o condición de la misma.

[0825] Con respecto a los procedimientos anteriores de tratamiento, el paciente es cualquier huésped. En algunas realizaciones, el huésped es un mamífero. Tal como se utiliza en este documento, el término "mamífero" se refiere a cualquier animal vertebrado de la clase Mammalia, incluyendo cualquiera de los órdenes de monotremas, marsupial, y placentarios. En algunas realizaciones, el mamífero es uno de los mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hamsters y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. En realizaciones de ejemplo, los mamíferos son del orden de carnívoros, que incluye felinos (gatos) y caninos (perros). En realizaciones de ejemplo, los mamíferos son del orden de los artiodáctilos, incluyendo bovinos (vacas) y cochinos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluidos los equinos (caballos). En algunos casos, los mamíferos son del orden de los primates, Ceboids, o Simoids

[0826] (monos) o de la orden de los antropoides (humanos y simios). En realizaciones particulares, el mamífero es un humano.

Combinaciones

[0827] Los conjugados **Q-L-Y** descritos en el presente documento pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos que tienen como objetivo tratar o prevenir cualquiera de las enfermedades o condiciones médicas descritas en el presente documento. Por ejemplo, los conjugados **Q-L-Y** descritos en el presente documento pueden ser co-administrados con (simultánea o secuencialmente) un agente anti-diabético o anti-obesidad. Los agentes anti-diabéticos conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen la insulina, la leptina, péptido YY (PYY), pancreático péptido (PP), factor de crecimiento fibroblástico 21 (FGF21), agonistas de los receptores Y2Y4, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirida (Amaryl), o gliclazida (Diamicon); meglitinidas, tales como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas, tales como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidindionas, tales como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos), o troglitazona (Rezulin), u otros inhibidores de PPAR γ ; inhibidores de la alfa-glucosidasa que inhiben la digestión de hidratos de carbono, tales como el miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/acarbosa); exenatide (Byetta) o pramlintide; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), tales como vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador de glucosa 1 dependiente de sodio); activadores de la glucoquinasa (GKA); antagonistas del receptor de glucagón (GRA); o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

[0828] Los agentes anti-obesidad conocidos en la técnica o bajo investigación incluyen supresores del apetito, incluyendo estimulantes de tipo fenetilamina, fentermina (opcionalmente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropión (Tenuate $\text{\textcircled{R}}$), fendimetrazina (Prelu-2 $\text{\textcircled{R}}$, Bontril $\text{\textcircled{R}}$), benzfetamina (Didrex $\text{\textcircled{R}}$), sibutramina (Meridia $\text{\textcircled{R}}$, Reductil $\text{\textcircled{R}}$); rimonabant (Acomplia $\text{\textcircled{R}}$), otros antagonistas de los receptores de cannabinoides; oxintomodulina; clorhidrato de fluoxetina (Prozac); Qnexa (topiramato y fentermina), Excalia (bupropión y zonisamida) o Contrave (bupropión y naltrexona), o inhibidores de lipasa, similar a XENICAL (Orlistat) o Cetilistat (también conocido como ATL- 962), o GT 389-255.

[0829] Los conjugados **Q-L-Y** descritos en este documento en algunas realizaciones son coadministrados con un agente para el tratamiento de enfermedad de hígado graso no alcohólico o NASH. Los agentes usados para tratar la enfermedad de hígado graso no alcohólico incluyen el ácido ursodesoxicólico (también conocido como Actigall, URSO, y Ursodiol), metformina (Glucophage), rosiglitazona (Avandia), Clofibrato, Gemfibrozilo, Polimixina B y Betaína.

[0830] Los conjugados **Q-L-Y** descritos en este documento, en algunas realizaciones, se coadministran con un agente para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, por ejemplo, la enfermedad de Parkinson. Los agentes contra la enfermedad del Parkinson son conocidos además en la técnica e incluyen levodopa, carbidopa, anticolinérgicos, bromocriptina, pramipexol, y ropinirol, amantadina y rasagilina.

[0831] En vista de lo anterior, la descripción proporciona además composiciones farmacéuticas y kits que comprenden, además, uno de estos otros agentes terapéuticos. El agente terapéutico adicional se puede administrar simultánea o secuencialmente con el análogo de la presente descripción. En algunos aspectos, el análogo se administra antes del agente terapéutico adicional, mientras que en otros aspectos, el análogo se administra después del agente terapéutico adicional.

Kits

[0832] Los conjugados **Q-L-Y** de la presente divulgación se pueden proporcionar según una realización como parte de un kit. Por consiguiente, en algunas otras realizaciones, se proporciona un kit para la administración de un conjugado **Q-L-Y** a un paciente en necesidad del mismo en el que el kit comprende un conjugado **Q-L-Y** como se describe en el presente documento.

[0833] En una realización, el kit se proporciona con un dispositivo para la administración de la composición de conjugado **Q-L-Y** a un paciente, por ejemplo, aguja de la jeringa, dispositivo de pluma, inyector de chorro u otro inyector sin aguja. El kit puede alternativamente o además incluir uno o más recipientes, por ejemplo, viales, tubos, botellas, jeringas precargadas de una o múltiples cámaras, cartuchos, bombas de infusión (implantables o externas), inyectores de chorro, dispositivos de pluma precargada y similares, que opcionalmente contienen el conjugado de glucagón en una forma liofilizada o en una solución acuosa. Los kits en algunas otras realizaciones comprenden instrucciones de uso. Según una realización, el dispositivo del kit es un dispositivo de dispensación de aerosol, en donde la composición viene preenvasada dentro del dispositivo aerosol. En otra realización, el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una realización la composición de glucagón estéril viene preenvasada dentro de la jeringa.

[0834] Los siguientes ejemplos se dan meramente para ilustrar la presente invención y no de ninguna manera para limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1 Síntesis de fragmentos peptídicos de péptidos de la superfamilia de glucagón

Material

[0835] Todos los péptidos descritos en el presente documento fueron amidados a menos que se especifique lo contrario. Se utilizó resina MBHA (resina de 4-metilbenzidrilamina poliestireno) durante la síntesis de péptidos. La resina MBHA, malla 100-180, poliestireno reticulado con DVB al 1%; carga de 0,7 a 1,0 mmol/g, aminoácido protegidos con Boc (terc-butilcarbamatos) y protegidos con Fmoc (carbamato de 9-fluorenil-metilo) se adquirieron en Midwest Biotech. Las síntesis de péptidos en fase sólida utilizando aminoácidos protegidos con Boc se realizaron en un sintetizador de péptidos Applied Biosystem 430A. La síntesis de aminoácidos protegidos con Fmoc se realizó utilizando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems Modelo 433.

Protocolo general de síntesis de péptidos con estrategia de química Boc

[0836] Síntesis de péptidos usando la química de Boc se realizó en el Applied Biosystem Modelo 430A sintetizador de péptidos. Los péptidos sintéticos se construyeron mediante la adición secuencial de aminoácidos para un cartucho que contiene 2 mmol de aminoácido protegido con Boc. Específicamente, la síntesis se llevó a cabo usando ácido 3- (dietoxi-fosforiloxi) -3H-benzo [d] [1,2,3] triazin-4-ona (DEPBT) o HBTU como agente de acoplamiento con acoplamientos individuales. Al final de la etapa de acoplamiento, la peptidil-resina se trató con ácido trifluoroacético (TFA) para eliminar el grupo protector Boc N-terminal. Después, la resina se lavó varias veces con dimetilformamida (DMF) y este ciclo repetitivo se repitió para el número deseado de etapas de acoplamiento. Los aminoácidos Boc y HBTU se obtuvieron de Midwest Biotech (Fishers, IN). Los grupos protectores de cadena lateral utilizados fueron: Arg (Tos), Asn (Xan), Asp (OCHex), Cys (pMeBzl), Su (Bom), Lys (2Cl-Z), Ser (OBzl), Thr (OBzl), Tyr (2Br-Z), y Trp (CHO). Boc-Glu (OFm) Boc-Lys (Fmoc) -OH -OH y (Chem-Impex, Wood Dale, IL) se utilizaron en los sitios de formación de lactama-puente.

[0837] Después del montaje de los péptidos, las cadenas laterales protegidos con Fmoc se desprotegieron usando tratamiento con piperidina 20%. Para la lactamización, se seleccionaron grupos protectores ortogonales para Glu y Lys (por ejemplo, Glu (Fm), Lys (Fmoc)). Después de la eliminación de los grupos protectores y antes de escisión con HF, la ciclación se realizó como se ha descrito previamente (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente Internacional N° WO2008/101017). tratamiento con HF de la peptidil-resina

[0838] La peptidil-resina se trató con HF anhidro en presencia de p-cresol y sulfuro de dimetilo, que típicamente

produjo aproximadamente 350 mg (rendimiento de aproximadamente el 50%) de un péptido desprotegido crudo. Específicamente, la peptidil-resina (30 mg a 200 mg) se colocó en un recipiente de reacción fluoruro de hidrógeno (HF) para la escisión. Después, se añadieron 500 ul de p-cresol a la vasija como un colector de iones carbonio. El recipiente se une al sistema de HF y sumergido en una mezcla de hielo de metanol/seco. El recipiente se evacuó con una bomba de vacío y 10 ml de HF se separó por destilación en el recipiente de reacción. Esta mezcla de reacción de la peptidil-resina y el HF se agitó durante una hora a 0 ° C. C, después de lo cual se estableció un vacío y el HF se evacuó rápidamente (10-15 min). El recipiente se retiró cuidadosamente y se llena con aproximadamente 35 ml de éter para precipitar el péptido y para extraer el p-cresol y pequeña molécula grupos protectores orgánicos resultantes del tratamiento de HF. Esta mezcla se filtró utilizando un filtro de teflón y se repitió dos veces para eliminar todo el exceso de cresol. Este filtrado se descartó. El péptido precipitado se disolvió en aproximadamente 20 ml de ácido acético al 10% (aq). Este filtrado, que contenía el péptido deseado, se recogió y se liofilizó.

[0839] Un análisis de HPLC analítica del péptido solubilizado en bruto se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones [4,6 X 30 mm Xterra C₈, 1,50 ml/min, 220 nm, un tampón de 0,1% TFA/10% de acetonitrilo (CH 3CN), tampón B 0,1% de TFA/100% CH 3CN, gradiente 5-95% de B durante 15 minutos]. El extracto se diluyó doble con agua y se cargó en una columna de fase inversa preparativa 2,2 X 25 cm Vydac C₄ y se eluye usando un gradiente de acetonitrilo en un sistema Waters HPLC (A tampón de TFA/CH 3CN, tampón B 10% 0,1% de 0,1% TFA/10% CH 3CN y un gradiente de 0-100% de B durante 120 minutos a un caudal de 15,00 ml/min. el análisis de HPLC del péptido purificado demostraron% de pureza mayor que 95 y la ionización electrospray masa análisis espectral se utilizó para confirmar la identidad del péptido.

Protocolo general de síntesis de péptidos con la estrategia de química Fmoc:

[0840] Los péptidos se sintetizaron en un sintetizador de péptidos automático ABI 433A usando química Fmoc estándar con resina Rink MBHA amida o primera resina Wang unida a aminoácidos (Novabiochem, San Diego, CA) utilizando DIC / HOBT como reactivo de acoplamiento. Los grupos protectores de la cadena lateral de Nalpha-Fmoc [N- (9-fluorenil) metoxicarbonil] aminoácidos fueron los siguientes: Arg, Pmc; Asp, OtBu; Cys, Trt; Gln, Trt; Su, Trt; Lys, Boc; Ser, tBu, Tyr, tBu; y Trp, Boc (Pmc = 2,2,5,7,8-pentametilchoman-6-sulfonilo, OtBu = terc-butilo éster, Trt = tritilo, Boc = terc-butiloxicarbonilo y tBu = terc-butilo éster). Se incorporaron Fmoc-Glu (O-2-PhiPr) -OH y Fmoc-Lys (Mmt) -OH (Novabiochem, San Diego, CA) en los sitios de formación de puente de lactama.

[0841] Después de la síntesis en fase sólida, el grupo 2-fenilisopropil (2-PhiPr) en el grupo 4-metoxitritilo (Mmt) en la Lys Glu y se eliminaron mediante el parpadeo de 1% de TFA/DCM, aunque la resina de peptidilo. Para la formación de lactama-puente, por lo general de 150 mg (0.5mmole, 5 veces) BEPBT se añadieron en 10% DIEA/DMF y se hizo reaccionar durante 2 a 4 horas hasta que el ensayo de ninhidrina se muestra negativa.

[0842] Los péptidos se escindieron de la resina con cóctel de escisión que contiene 85% de TFA, 5% de fenol, 5% de agua y 5% de tioanisol (se añadió 2,5% de EDT cuando péptido contiene cisteína). Los péptidos brutos se precipitaron en éter, se centrifugaron y se liofilizaron. Los péptidos se analizaron después mediante HPLC analítica y verificados por ESI o espectrometría de masas MALDI-TOF. Los péptidos se purificaron por el procedimiento general de purificación HPLC.

Acilación de péptidos

[0843] Los péptidos acilados se prepararon como sigue. Los péptidos se sintetizaron en una resina de soporte sólido utilizando un CS Bio 4886 sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A o sintetizador de péptidos. En química neutralización in situ se utilizó como se describe por Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). Para los péptidos acilados, el residuo de aminoácidos diana a ser acilado (por ejemplo, posición de diez, con respecto a la posición de numeración de aminoácidos de SEQ ID NO: 1601) se sustituyó con un residuo FMOC lisina N epsilon. El tratamiento de la completado N-terminalmente protegida con BOC péptido con 20% de piperidina en DMF durante 30 minutos retirados grupos/formilo Fmoc. El acoplamiento a la epsilon libre -amino residuo Lys se consiguió por reacción de un exceso de diez veces molar de cualquiera de un espaciador de aminoácidos protegidos con Fmoc (ex. FMOC-Glu-OtBu) o de la cadena de acilo (por ejemplo, CH₃ (CH₂)₁₄-COOH) y benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfonio (PyBOP), N, N'diisopropylcarbodiimide (DIC), o reactivo de acoplamiento DEPBT en DMF/diisopropiletilamina (DIEA). La eliminación subsiguiente del grupo FMOC el espaciador amino de ácido fue seguido por la repetición de acoplamiento con una cadena de acilo. El tratamiento final con 100% de TFA como resultado la eliminación de cualquier cadena lateral de los grupos protectores y el grupo BOC N-terminal. Las resinas peptídicas se neutralizaron con DIEA al 5%/DMF, se secaron, y después se separan del soporte usando HF/p-cresol, 95: 5, a 0°C durante una hora. Después de extracción con éter, una solución (HOAc) 5% de ácido acético se utilizó para solvatar el péptido en bruto. A continuación, se verificó una muestra de la solución para contener el péptido de peso molecular correcto por ESI-MS. péptidos correctas se purificaron por HPLC de fase inversa (RP) usando un gradiente lineal de 10% CH 3CN/TFA al 0,1% a 0,1% de TFA en 100% CH 3CN. Una columna mm proteína Vydac C₁₈ 22 mm x 250 se utilizó para la purificación. Acilados conjugados peptídicos generalmente completaron elución por una relación de amortiguamiento de 20:80. Las porciones se agruparon y comprobó la pureza de en una RP-HPLC analítica. Las fracciones puras se liofilizaron proporcionando blancos péptidos, sólidos.

[0844] Si un péptido que comprende restos de un puente de lactama y de destino a ser acilado, acilación se llevó a cabo como se describe anteriormente con la adición de que el aminoácido a la cadena principal del péptido.

5 *PEGilación de péptidos para formar enlaces tioéter*

[0845] Para péptido PEGilación, 40 kDa metoxi poli(etilenglicol) idoacetamide se hizo reaccionar con un equivalente molar de péptido en urea 7 M, tampón Tris-HCl 50 usando la cantidad mínima de disolvente necesaria para disolver tanto el péptido y el PEG en una clara solución (generalmente menos de 2 ml para una reacción utilizando péptido de 2 a 3 mg). La agitación vigorosa a temperatura ambiente se inició durante 4 a 6 horas y la reacción se analizó por RP-HPLC analítica. Los productos PEGilados aparecieron claramente del material de partida con tiempos de retención disminuido. La purificación se realizó en una columna Vydac C₄ con condiciones similares a las utilizadas para la purificación del péptido inicial. La elución se produjo aproximadamente relaciones de amortiguamiento de 50:50. Las fracciones de péptido pegilado pura se encontraron y se liofilizaron. Los rendimientos fueron superiores al 50%, variando por reacción.

PEGilación de péptidos para formar enlaces maleimido

[0846] Para la PEGilación de péptidos, el péptido contiene una cisteína se disolvió en solución salina tamponada con fosfato (5- to0 mg/ml) y se añade ácido tetraacético 0,01 M de etilendiamina (10-15% del volumen total). Se añadió un exceso (2 veces) maleimido reactivo metoxiPEG (Dow) y la reacción se agitó a temperatura ambiente durante el seguimiento de progreso de la reacción por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Después de 8-24 horas, la mezcla de reacción se acidifica y se cargó en una columna preparativa de fase inversa para la purificación usando ácido tetrafluoroacetic 0,1% (TFA)/acetonitrilo en el modo de gradiente. Las fracciones apropiadas se combinaron y se liofilizaron para dar los derivados pegilados deseados.

Análisis utilizando espectrometría de masas

[0847] Los espectros de masas se obtuvieron usando un espectrómetro de masas cuadrupolo Sciex API electrospray-III con una fuente de iones estándar ESI. Las condiciones de ionización que se utilizaron son como sigue: ESI en el modo de ion positivo; voltaje de pulverización de iones, 3,9 kV; potencial orificio, 60 V. El gas de nebulización y de cortina utilizada fue la tasa de flujo de nitrógeno de 0,9 L/min. Los espectros de masas se registraron a partir 600-1800 Thompsons en 0,5 Th por paso y 2 ms de tiempo de reposo. La muestra (aproximadamente 1 mg/ml) se disolvió en acetonitrilo acuoso al 50% con ácido acético al 1% y se introduce por una bomba de jeringa externa a razón de 5 ul/min.

[0848] Cuando los péptidos se analizaron en solución de PBS por ESI MS, que se desalaron primero usando una punta de extracción en fase sólida ZipTip que contiene 0,6 uresina L C₄, según las instrucciones proporcionadas por el fabricante (Millipore Corporation, Billerica, MA, véase la Millipore página web de la World Wide web en millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737).

Análisis con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):

[0849] Los análisis preliminares se realizaron con estos péptidos en bruto para obtener una aproximación de sus tasas de conversión relativas en tampón de salina tamponada con fosfato (PBS) (pH, 7,2) usando la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y el análisis MALDI. Las muestras de péptidos en bruto se disolvieron en el tampón de PBS a una concentración de 1 mg/mL. 1 ml de la solución resultante se almacenó en un vial de 1,5 ml HPLC que luego se selló y se incubó a 37°C. Alícuotas de 100 ul se extrajeron a cabo en diversos intervalos de tiempo, se enfrió a temperatura ambiente y se analizaron por HPLC.

[0850] Los análisis de HPLC se realizaron usando un sistema de cromatografía System Gold de Beckman usando un detector de UV a 214 nm. Análisis de HPLC se realizó en una columna C₁₈ Vydac 150 mm x 4,6 mm. El caudal fue de 1 ml/min. Disolvente A contenía 0,1% de TFA en agua destilada, y el disolvente B contenía 0,1% de TFA en 90% CH₃CN. Un gradiente lineal se empleó (40% a 70% de B en 15 minutos). Los datos fueron recogidos y analizados utilizando el software de pico simple cromatografía.

Ejemplo 2

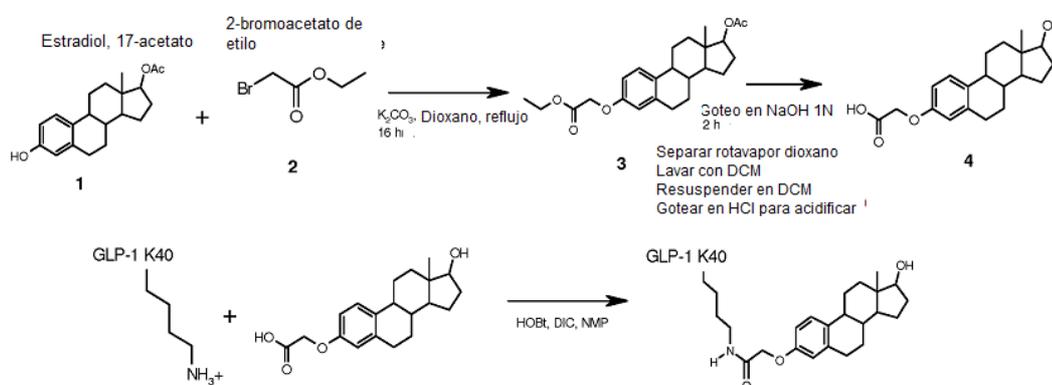
[0851] La capacidad de cada péptido para inducir AMPc se midió en un ensayo indicador de basado en la luciferasa de luciérnaga. La producción de AMPc que es inducida es directamente proporcional al fragmento de glucagón unión al receptor de glucagón o el receptor de GIP o receptor de GLP-1. Las células HEK293 co-transfectadas con el gen del receptor y luciferasa unidos a un elemento de respuesta a AMPc fueron empleados para el bioensayo.

[0852] Las células fueron privadas de suero mediante el cultivo dE¹⁶ horas en Dulbecco modificado con medio esencial mínimo (Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementado con 0,25% de crecimiento bovina sérica (Hyclone, Logan, UT) y a continuación se incubaron con diluciones seriadas de fragmentos de glucagón durante 5 horas a 37°C, 5%

de CO₂ en placas de 96 pocillos-D-lisina recubierto-poli "Biocoat" (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación, 100 ul de LucLite reactivo sustrato de luminiscencia (Perkin Elmer, Wellesley, MA) se añadieron a cada pocillo. La placa se agitó brevemente, se incubaron 10 min en la salida de luz y oscuridad se midió en MicroBeta-1450 contador de centelleo líquido (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Los eficaces concentraciones del 50% (CE50) y concentraciones inhibitorias del 50% (IC₅₀) se calcularon mediante el uso de software de Origen (OriginLab, Northampton, MA). Todos EC₅₀ e IC₅₀ se indica en los siguientes ejemplos en nM, a menos que se indique lo contrario.

Ejemplo 3: Preparación de GLP-1/estrógeno (3-éter)

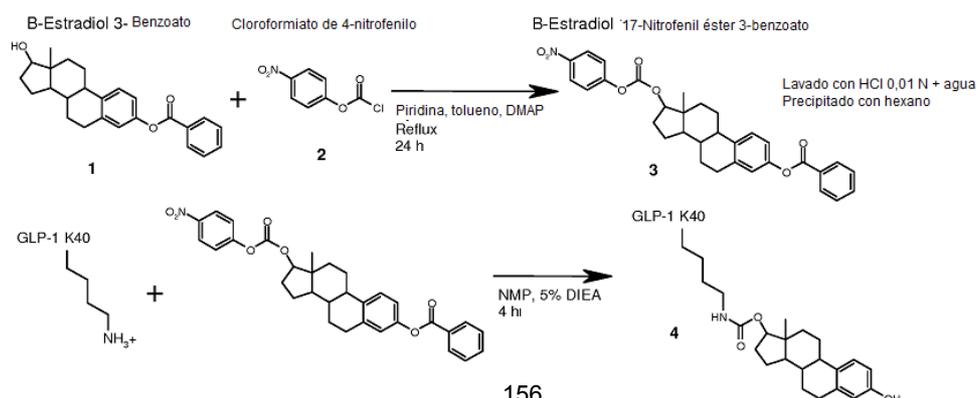
[0853] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1 con un residuo -OH Boc-Lys (Fmoc) en el extremo C-terminal. (El grupo Fmoc la protección de la amina de cadena lateral en el residuo de lisina se separó con 20% piperidina/DMF durante 30 minutos antes de la adición de producto 4.) Estradiol 17-acetato fue derivatizados en la posición 3 por reacción con ácido 2-bromoacético. El estradiol derivatizado se hidrolizó y se hizo reaccionar con la lisina C-terminal del análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estrógeno (3-éter), como se muestra a continuación:



[0854] Específicamente, cantidades equimolares de estradiol 17-acetato (1) y acetato de 2-bromoacetato (2) se disolvieron en dioxano/K₂CO₃, y la reacción se agitó durante 16 horas bajo condiciones de reflujo. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en dioxano. Se añadió lentamente NaOH (1N) y se agitó durante 2 horas. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (4) se lavó 3 veces y re-suspendió en diclorometano. Se añadió lentamente HCl (1N) para acidificar el producto. Producto 4 y el péptido unido a la resina se mezclaron en HOBt/DIC/NMP durante 4 horas, se filtró, se trató con ácido trifluoroacético, y se escindieron de la resina mediante tratamiento con ácido fluorhídrico. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó mediante espectrometría de masas ESI.

Ejemplo 4: Preparación de GLP-1/estrógeno (17-carbamato)

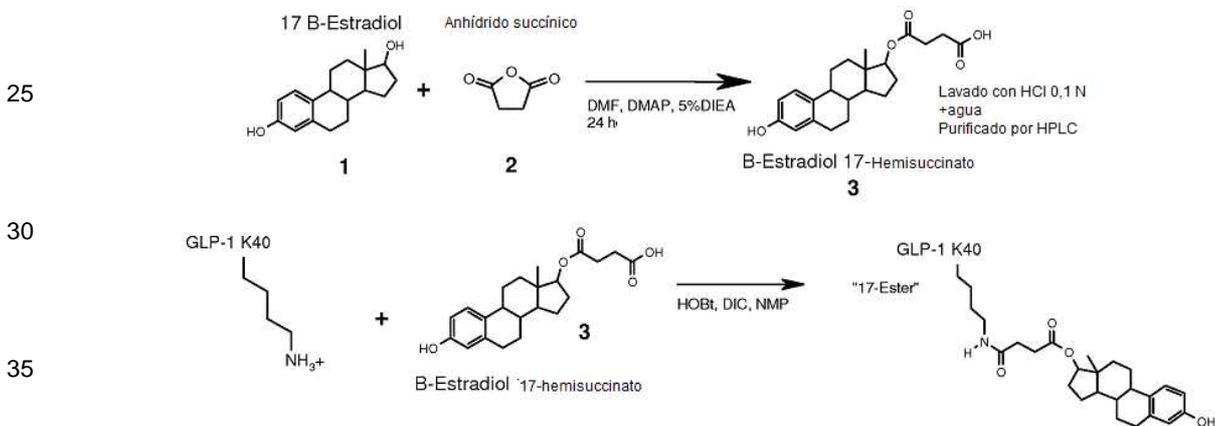
[0855] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1 con un residuo -OH Boc-Lys (Fmoc) en el extremo C-terminal. (El grupo Fmoc la protección de la amina de cadena lateral en el residuo de lisina se separó con 20% piperidina/DMF durante 30 minutos antes de la conjugación del derivado de estrógeno). B-estradiol 3-benzoato se derivatizados en la posición 17 por reacción con cloroformiato de 4-nitrofenilo. El estradiol derivatizado con reaccionado con la lisina C-terminal de un análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estrógeno (17-éster), como se muestra a continuación:



5 **[0856]** Específicamente, beta-estradiol 3-benzoato de metilo (1) y un exceso de 2 veces de 4-nitrofenil cloroformiato de (2) se agitaron juntos en piridina, tolueno y DMAP en condiciones de reflujo durante 24 horas. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto, beta-estradiol éster 17-nitrofenil 3-benzoato de metilo (3), se resuspendió en acetato de etilo. El producto de reacción se lavó dos veces con HCl acuoso (0,01 N) seguido de un único lavado con agua. El acetato de etilo se evaporó a vacío y el producto (3) se precipitó con hexano. Producto 3 y el péptido unido a la resina se mezclaron en NMP/DIEA al 5% durante 4 horas, se filtró, se trató con TFA, y se escindieron de la resina mediante tratamiento con HF. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó mediante espectrometría de masas ESI.

15 Ejemplo 5: Preparación de GLP-1/estrógeno (17-éster)

15 **[0857]** Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1 con un residuo -OH Boc-Lys (Fmoc) en el extremo C-terminal. (El grupo Fmoc la protección de la amina de cadena lateral en el residuo de lisina se separó con 20% piperidina/DMF durante 30 minutos antes de la conjugación del derivado de estrógeno). Estradiol se derivatizó en la posición 17 por reacción con anhídrido succínico. El estradiol derivatizado con reaccionado con la lisina C-terminal de un análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estrógeno (17-éster), como se muestra a continuación:



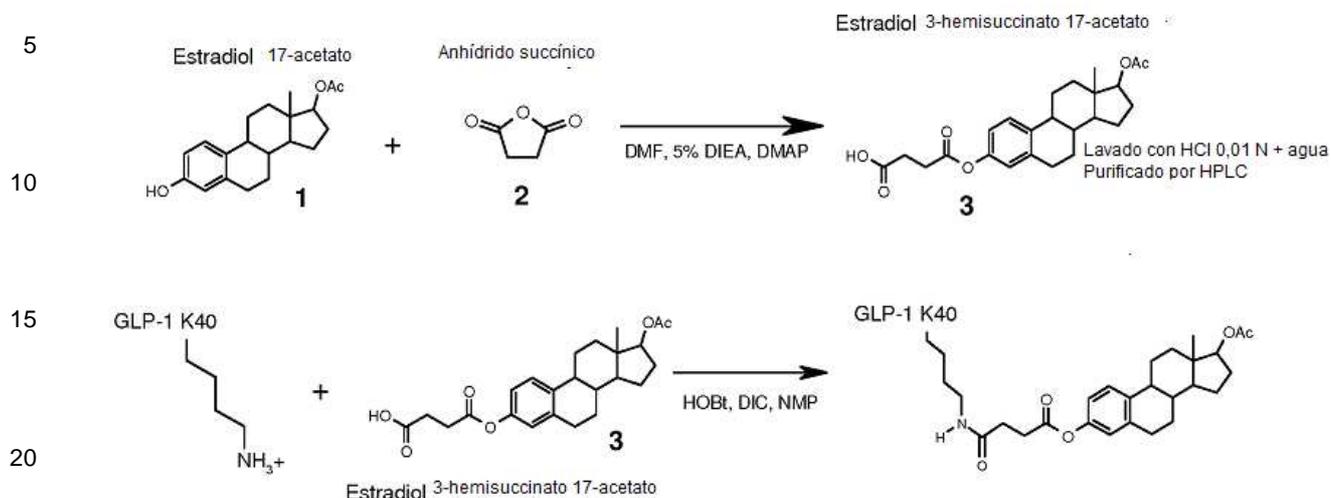
40 **[0858]** Específicamente, beta-estradiol 17-acetato (1) y un exceso de 10 veces de anhídrido succínico (2) se agitaron juntos en DMF con DIEA al 5% y DMAP durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de 48 horas, el disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en acetato de etilo. El producto de reacción (3) se lavó con HCl acuoso (0,01 N) dos veces seguido de un único lavado con agua. El acetato de etilo se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en una mezcla de MeOH/acetonitrilo/agua. El producto derivado de estrógeno (3) se purificó por HPLC de fase inversa. Liofilizado producto (3) y el péptido unido a la resina se mezclaron en HOBt/DIC/NMP durante 4 horas, se filtró, se trató con TFA, y se escindieron de la resina mediante tratamiento con HF. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó mediante espectrometría de masas ESI.

50 Ejemplo 6: Preparación de GLP-1/estrógeno (3-Éster)

55 **[0859]** Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc que se describe en el Ejemplo 1 con un residuo -OH Boc-Lys (Fmoc) en el extremo C-terminal. (El grupo Fmoc la protección de la amina de cadena lateral en el residuo de lisina se separó con 20% piperidina/DMF durante 30 minutos antes de la conjugación del derivado de estrógeno). Estradiol 17-acetato se derivatizó en la posición 3 por reacción con anhídrido succínico. El estradiol derivatizado con reaccionado con la lisina C-terminal del análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estrógeno (3-éster), como se muestra a continuación:

60

65



25

30

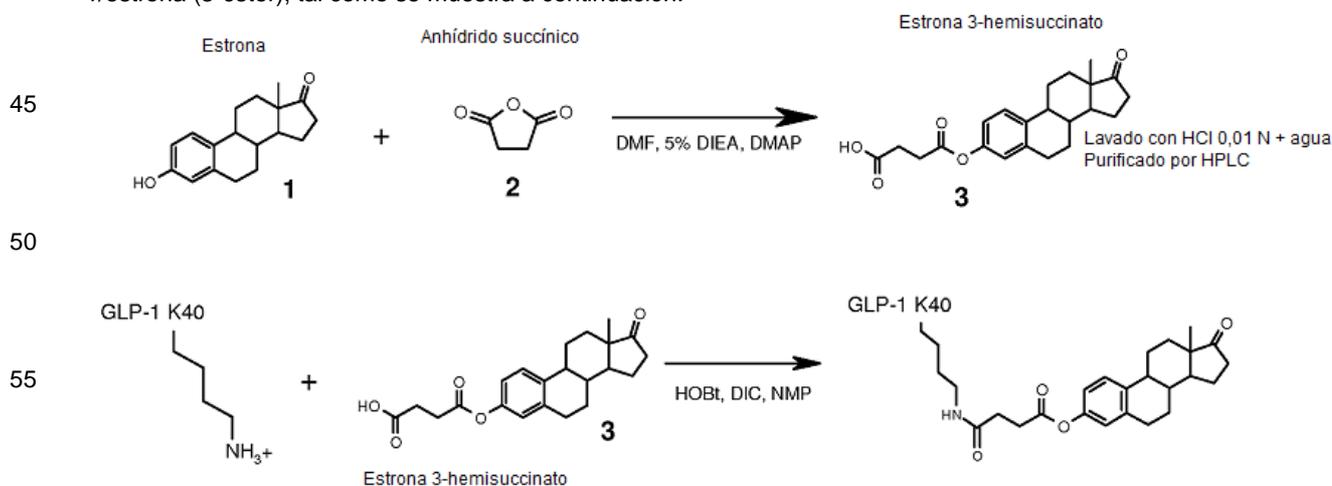
[0860] Específicamente, beta-estradiol 17-acetato (1) y un exceso de 10 veces de anhídrido succínico (2) se agitaron juntos en DMF con DIEA al 5% y DMAP durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de 48 horas, el disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en acetato de etilo. El producto de reacción (3) se lavó con HCl acuoso (0,01 N) dos veces seguido de un único lavado con agua. El acetato de etilo se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en una mezcla de MeOH/acetonitrilo/agua. El producto derivado de estrógeno (3) se purificó por HPLC de fase inversa. Liofilizado producto (3) y el péptido unido a la resina se mezclaron en HOBt/DIC/NMP durante 4 horas, se filtró, se trató con TFA, y se escindieron de la resina mediante tratamiento con HF. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó mediante espectrometría de masas ESI.

35

Ejemplo 7: Preparación de GLP-1/estrona 3-Ester

40

[0861] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc que se describe en el Ejemplo 1 con un residuo -OH Boc-Lys (Fmoc) en el extremo C-terminal. (El grupo Fmoc la protección de la amina de cadena lateral en el residuo de lisina se separó con 20% piperidina/DMF durante 30 minutos antes de la conjugación del derivado de estrógeno). La estrona se derivatizó en la posición 3 por reacción con anhídrido succínico. La estrona derivatizada reaccionó con la lisina C-terminal del análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estrona (3-éster), tal como se muestra a continuación:



65

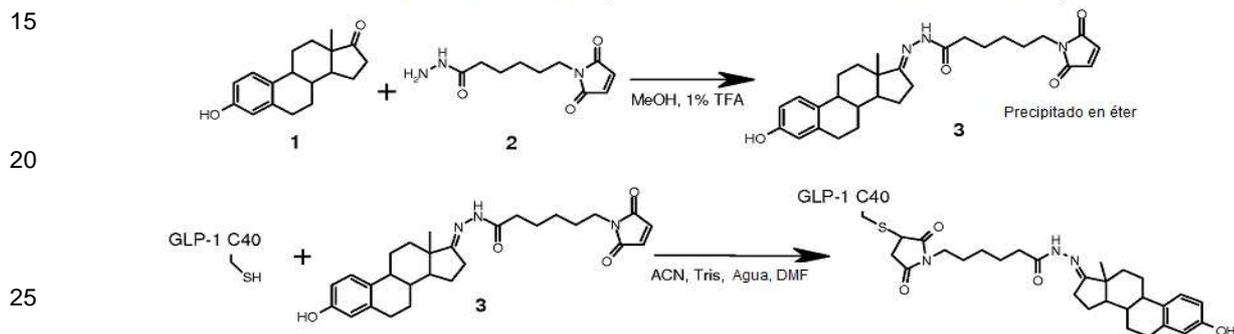
[0862] Específicamente, la estrona (1) y un exceso de 10 veces de anhídrido succínico (2) se agitaron juntos en DMF con DIEA al 5% y DMAP durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de 48 horas, el disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en acetato de etilo. El producto de reacción (3) se lavó con HCl acuoso (0,01 N) dos veces seguido de un único lavado con agua. El acetato de etilo se evaporó a vacío y el producto (3) se resuspendió en una mezcla de MeOH/acetonitrilo/agua. El producto derivado de estrona (3) se

purificó por HPLC de fase inversa. El producto liofilizado (3) y el péptido unido a la resina se mezclaron en HOBt/DIC/NMP durante 4 horas, se filtró, se trató con TFA, y se escindieron de la resina mediante tratamiento con HF. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó mediante espectrometría de masas ESI.

5

Ejemplo 8: Preparación de GLP-1/estrógeno (17-hidrazona)

[0863] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1. El péptido se sintetizó usando Boc-basado en la química de neutralización in situ con un Boc-Cys (4-MeBzl) residuo -OH en el extremo C-terminal a facilitar la adición de estrógeno. La estrona se derivatizó en la posición 17 por reacción con hidrazida del ácido maleimidocaproico. La estrona derivatizada reaccionó con la cisteína C-terminal del análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estradiol (17-hidrazona), tal como se muestra a continuación:



[0864] Específicamente, cantidades equimolares de estrona (1) y epsilon hidrazida de ácido -maleimidocaproic (2) se agitaron juntos en MeOH con TFA al 0,1% durante 4 horas a temperatura ambiente. Después de 4 horas, el disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (3) se precipitó en éter frío y se purificó en una columna de sílice. Un exceso de 5 veces de producto 3 se mezcló con el péptido escindido y purificado en una mezcla de DMF, ACN, Tris, y agua a pH 7,5 durante 24 horas a temperatura ambiente para generar el conjugado de péptido-estrógeno. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó por espectroscopía de masas ESI.

35

Ejemplo 9: Preparación de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro) (impedido y no impedido)

[0865] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1. El péptido se sintetizó usando Boc-basado en la química de neutralización in situ con un Boc-Cys (4-MeBzl) residuo -OH (para dar como resultado un conjugado de disulfuro no impedido) o un Boc-Pen (4-MeBzl) residuo -OH (para dar lugar a un conjugado de disulfuro impedido) en el extremo C-terminal para facilitar la adición de estrógeno. B-estradiol 3-benzoato se derivatizó en la posición 17 por reacción con cloroformiato de 4-nitrofenilo. El intermedio se hace reaccionar entonces con piridilditio-etilamina-HCl y se sometieron a una reacción de intercambio de disulfuro a la cisteína C-terminal del análogo de GLP-1 para dar como resultado el conjugado GLP-1/estradiol (17-carbamato disulfuro), como se muestra a continuación:

50

55

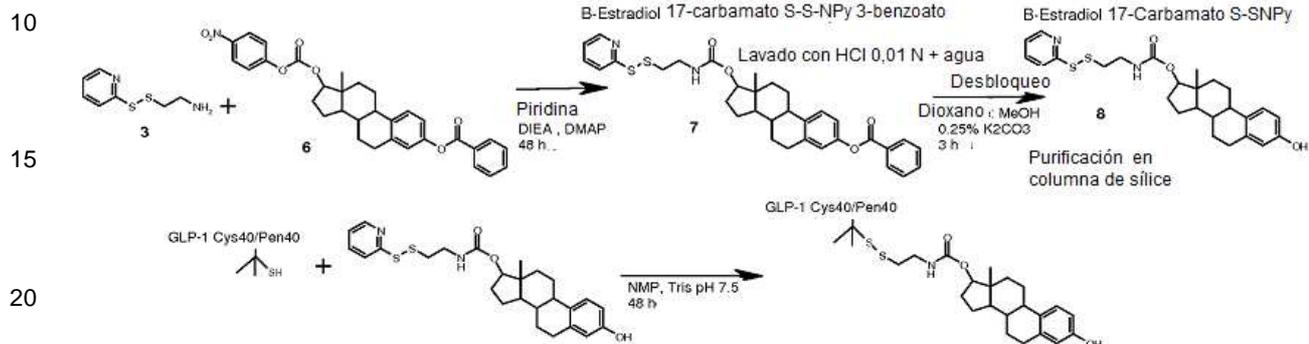
60

[0866] En primer lugar, cantidades equimolares de Aldritiol-2 (1) y 2-mercaptoetilamina HCl (2) se agitaron juntos en MeOH con 2% de AcOH durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de 48 horas, el disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (3) se precipitó en éter frío. En segundo lugar, beta-estradiol 3-benzoato de etilo (4) y un exceso de 2 veces de 4-nitrofenil cloroformiato de (5) se agitaron juntos en piridina, tolueno y DMAP en

65

condiciones de reflujo durante 4 horas. El disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto, beta-estradiol éster 17-nitrofenil 3-benzoato de metilo (6), se resuspendió en acetato de etilo. Este producto de reacción se lavó dos veces con HCl acuoso (0,01 N) seguido de un único lavado con agua, que se elimina en un embudo de separación. El acetato de etilo se evaporó a vacío y el producto (6) se precipitó con hexano.

5

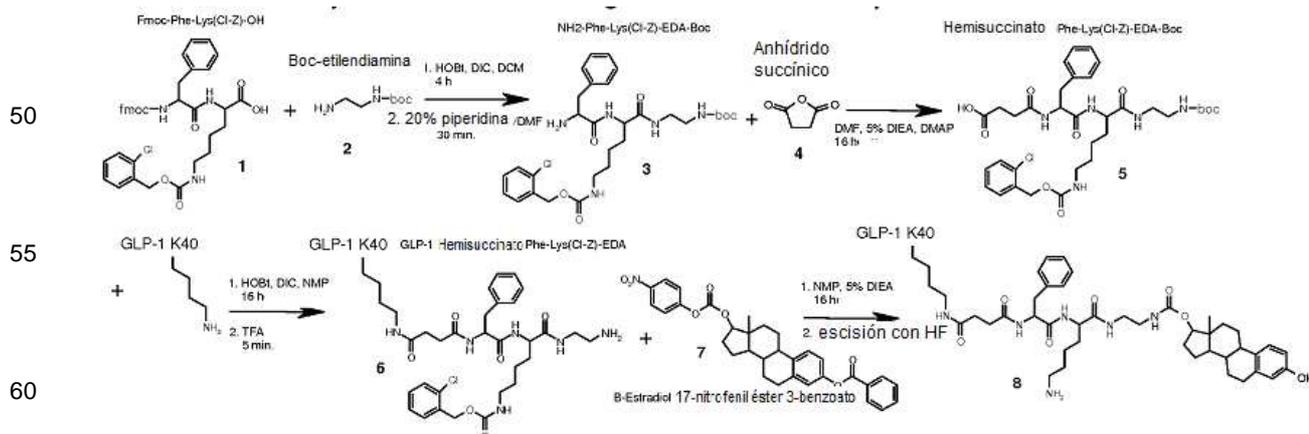


[0867] Se agitaron cantidades equimolares de HCl piridiliditio-etilamina (3) y beta-estradiol éster 17-nitrofenil 3-benzoato de metilo (6) juntos en piridina con DIEA al 5% y DMAP durante 48 horas a temperatura ambiente. Después de 48 horas, el disolvente de reacción se evaporó a vacío y el producto (7) se resuspendió en acetato de etilo. Este producto de reacción se lavó dos veces con HCl acuoso (0,01 N) seguido de un único lavado con agua, y el acetato de etilo se evaporó a vacío. El grupo 3-benzoato de producto (7) se eliminó por tratamiento con 0,25% de K₂CO₃ en dioxano y metanol durante 3 horas a temperatura ambiente para generar el producto beta-estradiol 17-carbamato SS-NPY (8), que se purificó en una columna de sílice. Un exceso de 5 veces de producto 8 se mezcló con el péptido escindido y purificado (ya sea con un residuo de cisteína o un residuo de penicilamina en la posición 40) en NMP y Tris a pH 7,5 durante 48 horas a temperatura ambiente para generar el conjugado de péptido-estrógeno. El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó por espectroscopía de masas ESI

Ejemplo 10: Preparación de GLP-1/estrógeno (17-catepsina diaminoetano)

[0868] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1. El péptido se sintetizó usando Boc-basado en la química de neutralización in situ con una-His Z (BOM) -OH residuo en el extremo N-terminal, y una Boc-Lys (Fmoc) -OH en el extremo C-terminal para facilitar la adición del espaciador dipéptido y estrógeno. B-Estradiol 17-nitrofenil benzoato de éster se derivatized en la posición 17 para dar como resultado el conjugado GLP-1/Estradiol (17-Catepsina diaminoetano), como se muestra a continuación:

45



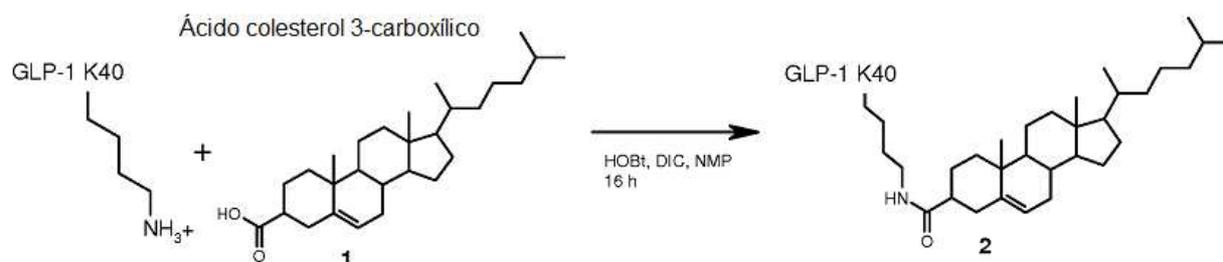
[0869] Fmoc-Phy-Lys (CI-Z) -OH (1) se sintetizó utilizando Fmoc-base en la química de neutralización in situ en una resina de Wang, y se escindió de la resina con TFA/DCM. Cantidades equimolares de Fmoc-Phe-Lys (CI-Z) -OH (1) y (2) Boc-etilendiamina se agitaron juntos en HOBT, DIC, y DCM durante 4 horas a temperatura ambiente. Este

65

producto de reacción se lavó dos veces con HCl acuoso (0,01 N) seguido de un único lavado con agua, que se elimina en un embudo de separación, y el acetato de etilo se evaporó a vacío. Después de las etapas de lavado, el producto de reacción se trató con 20% de piperidina en DMF durante 30 minutos para eliminar el grupo Fmoc N-terminal para generar NH₂-Phe-Lys (Cl-Z) -EDA-Boc (3), que se precipitó en éter frío después de eliminar el/DMF disolvente piperidina al vacío. NH₂-Phe-Lys (Cl-Z) -EDA-Boc (3) se agitó con un exceso de 2 veces de anhídrido succínico (4) en DMF, DIEA al 5%, y DMAP durante 16 horas a temperatura ambiente, después de lo cual el disolvente de reacción se evaporó a vacío y se resuspendió en MeOH, acetonitrilo, y agua. El producto de reacción, hemisuccinato-Phe-Lys (Cl-Z) -EDA-Boc (5), se purificó por HPLC de fase inversa. Un exceso de 5 veces de producto liofilizado (5) y el péptido unido a la resina se mezclaron en HOBt/DIC/NMP durante 16 horas, se filtró, y se trató con TFA para generar el producto GLP-1 + hemisuccinato-Phe-Lys (Cl-Z) -EDA (6). Este producto unido a la resina (6) se mezcló con un exceso de 5 veces de beta-estradiol éster 17-nitrofenil 3-benzoato de metilo (7) en NMP/DIEA al 5% durante 16 horas, se filtró, y se escindió de la resina mediante tratamiento con HF para generar el producto final (8). El conjugado de péptido-estrógeno se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó por espectroscopía de masas ESI.

Ejemplo 11: Preparación de GLP-1/Colesterol 3-amida

[0870] Un análogo de GLP-1 se sintetizó utilizando el protocolo de Boc se describe en el Ejemplo 1. El péptido se sintetizó usando Boc-basado en la química de neutralización in situ con un Boc-Lys (Fmoc) -OH residuo en el extremo C-terminal. Colesterol ácido 3-carboxílico se hizo reaccionar a la con la lisina C-terminal del análogo de GLP-1 para dar como resultado en el conjugado GLP-1/Colesterol (3-amida), como se muestra a continuación:



[0871] Específicamente, el colesterol 3-carboxílico (1) y el péptido unido a la resina se mezclaron en HOBt/DIC/NMP durante 16 horas, se filtró, se trató con TFA, y se escindió de la resina mediante tratamiento con HF. El grupo Fmoc la protección de la amina de cadena lateral en el residuo de lisina se separó con 20% piperidina/DMF durante 30 minutos antes de la adición de producto 4. El conjugado-colesterol péptido (2) se purificó usando HPLC de fase inversa y se caracterizó por ESI espectrometría de masas. Si el esqueleto peptídico fue PEGilada, a continuación, un residuo de cisteína se añadió en la posición 24 en la secuencia para facilitar la adición de la fracción de PEG, que se añadió al conjugado péptido-colesterol mezclando cantidades equimolares de yodoacetilo 40k PEG con el conjugado en una urea 7 M/tampón 0,05 M Tris a pH 8,5 durante 1 hora.

Ejemplo 12: Ensayo de unión a receptor de estrógeno

Protocolo con Phosphoimager con ER α purificado y placa de filtros Millipore

[0872] Los siguientes reactivos se utilizaron para llevar a cabo el ensayo de unión del receptor de estrógeno: Ligand Binding Buffer (pH 7,6), sal 50 mM HEPES-sodio, 1 mM de CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 0,5% BSA, colchón de sacarosa (pH 7,6), 20% de sacarosa, NaCl 120 mM, 40 mM Tris-HCl, 0,4% de BSA, polietilenimina (PEI), y 0,25% de PEI.

Titulación de estradiol "frío"

[0873] Una dilución madre de estradiol frío a 5 veces mayor concentración A continuación se preparó la concentración de ensayo más alta deseada. La concentración más alta que se probó es 10 μ M. Por lo tanto, un stock de 50 μ M se preparó con un volumen total de 500 μ l. Exactamente 40 μ l de tampón de unión se añadió a cada pocillo de una placa de valoración, con exclusión de las columnas 11 y 12. Exactamente 60 μ l de la concentración de solución madre se añadió a cada pocillo de la columna 11 de la placa de titulación. Una valoración de 3 veces se realizó mediante la transferencia de 20 μ l de la columna 11 a la columna 10 y la mezcla. Cada columna posterior a través de la columna 1 se tituló. Exactamente 20 μ l se transfirió desde cada pocillo de la placa de valoración a los pocillos correspondientes de la placa de ensayo. Exactamente se añadió 20 μ l de tampón de unión a los pocillos "unión total" (pozos 12 (AD)). Exactamente se añadió 20 μ l de 100 μ M de estradiol frío a los pocillos "unión no específica" (pozos 12 (EH)).

Concentración constante de estradiol "caliente"

[0874] Una solución madre de estradiol marcado se prepara a una 5 veces la concentración más alta que la concentración de ensayo deseada, que es 0,05 nM. Por lo tanto, un stock de 0,25 nM estradiol marcado se prepara con al menos un volumen total de 2,3 ml. El estradiol marcado viene en solución a 10 uCi a un volumen de 100 ul, que se correlaciona con una concentración de 45,45 nM usando la conversión de 2200 Ci/mmol. Para 2,3 ml de una acción 0,25 nM, se añadió 12,65 ul del estradiol marcado con 2,29 ml de tampón de unión. Exactamente se añadió 20 ul de solución madre a cada pocillo de la placa de ensayo según el diseño.

Titulación del receptor alfa de estrógeno purificado

[0875] El receptor de estrógeno purificado se ensayó a una concentración de 1,5 nM. Debido a que 60 ul de receptor de estrógeno se añadió a cada pocillo, se preparó una concentración de reserva que era 1.667 veces superior. Para una concentración de ensayo de 1,5 nM, una concentración de stock de 2,5 nM fue preparada. Un volumen de 7,0 ml de 2,5 nM receptor se preparó añadiendo 8,4 ul de la acción a 6,99 ml de tampón de unión. Exactamente 60 ul de los receptores se transfirió entonces a los pocillos adecuados en la placa de ensayo.

Ensayo

[0876] La placa de ensayo (que contiene el ligando frío, ligando caliente, y los lisados de células) se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Exactamente 25 ul de 0,25% de PEI se añadió a cada pocillo de la placa de filtro. La placa de filtro se dejó incubar durante 20 minutos antes de borrar los pocillos mediante vacío. Exactamente 80 ul de las suspensiones en la placa de ensayo se transfirió a la placa de filtro con recubrimiento de PEI. Las muestras fueron aspiradas a través de la placa de filtro usando el colector de vacío. Las placas de filtro se lavaron las placas varias veces con tampón de unión y luego envueltos en celofán. Las placas se fijan en la superficie de la pantalla de fósforo de imágenes con los fondos así más cercanos a la pantalla. La pantalla de fósforo-de formación de imágenes y la placa se colocó en una bolsa de película de radio y se expusieron durante 48 horas. La pantalla de imagen se escaneó usando el Phosphorimager y se recogió el archivo de la exposición.

Ejemplo 13

[0877] Los ratones (db/db, N = 6, promedio de peso corporal inicial = 54 g) se inyectaron por vía subcutánea una vez al día durante cuatro semanas con vehículo o 40 o 400 ug/kg de una de las siguientes:

- (a) GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰) (400 ug/kg-día),
- (b) GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) (40 ug/kg-día), o
- (c) GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) (400 ug/kg-día).

[0878] El peso corporal se midió después de 23 días y se determinó el cambio en el peso corporal (Figura 2a). Los ratones que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentaron una mayor disminución en el peso corporal a continuación, los ratones que se les administró GLP-1 solo.

[0879] El efecto del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) también se determinó en la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 23 días. Los ratones que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (17-éster)/estrógeno (17-éster) consumen menos comida que los que se les administró GLP-1 solo.

[0880] Las Figuras 2b y 2c muestran el efecto del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) en los niveles de glucosa en sangre (mg/dl). Los ratones que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentaron la mayor disminución de los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 14.

Ejemplo 14. Efectos *in vivo* de conjugados de GLP-1/estrógeno

[0881] Ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO) (N = 8, 6 ratones por grupo, peso promedio corporal inicial = 58 g) se inyectan por vía subcutánea una vez al día durante cuatro semanas con vehículo o 4, 40, o 400 ug/kg de una de las siguientes:

- (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶exK⁴⁰) (40 ug/kg-día),
- (b) GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰) (400 ug/kg-día), o
- (c) GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) (4, 40, o 400 ug/kg-día).

[0882] Una solución salina que comprende 25% (v/v) de glucosa se inyectó a una dosis de 1,5 g/kg de peso corporal en el punto de tiempo 0 min en los días 7 y glucosa 21. La sangre se midió en la 0, 15, 30, 60, y 120 puntos de tiempo min el día 7 y día 21 (Figura 3A).

[0883] El peso corporal se midió después de 23 días y el cambio en el peso corporal, el cambio en la masa de grasa, y el cambio en la masa muscular magra se determinaron (Figuras 3b-d). Los ratones que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentaron la mayor disminución en el

peso corporal y la masa grasa, y la menor cantidad de músculo magro pérdida de masa.

5 **[0884]** El efecto de la GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰) también se determinó/estrógeno (17-éster) conjugado en la ingesta de alimentos acumulativa durante un período de 23 días. Los ratones que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) consumieron la menor cantidad de comida.

10 **[0885]** La Figura 3E muestra el efecto del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) en la glucosa cambio sangre. Los ratones que se les administró una dosis alta del conjugado GLP-1 (Aib²A²²CexK⁴⁰)/estrógeno (17-éster) experimentó la mayor disminución en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 14. Estos resultados demuestran la añadido dosis eficacia dependiente de la adición de estrógeno a un débil basado-A22 agonista de GLP-1.

Ejemplo 15.

15 **[0886]** Ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO) (N = 8, promedio de peso corporal inicial = 59 g) se inyectaron por vía subcutánea una vez al día durante cuatro semanas con vehículo o una de las siguientes:
 (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) (40 o 400 ug/kg-día),
 (b) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster) (40 o 400 ug/kg-día), o
 (c) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) (40 o 400 ug/kg-día).

20 **[0887]** Una solución salina que comprende 25% (v/v) de glucosa se inyectó a una dosis de 1,5 g/kg de peso corporal en el punto de tiempo 0 min el día 14. Los niveles de glucemia se midieron en los puntos de tiempo a 0, 15, 30, 60, y 120 min. La figura 4a presenta los datos de este experimento.

25 **[0888]** El peso corporal se midió después de 21 días y el cambio en el peso corporal y la grasa masa total se determinaron (Figuras 4b-c). Los ratones que se les administró una dosis alta de conjugados de GLP-1/estrógeno experimentó la mayor disminución en el peso corporal total (Figura 4b). La masa grasa se redujo en la dosis alta de estrógeno éter conjugado respecto a los animales tratados con vehículo (Figura 4C). Los conjugados de éter tenían un mayor efecto sobre el peso corporal total de los conjugados de éter, y los conjugados de éter tenido un mayor efecto en la masa grasa de los conjugados éter.

30 **[0889]** El efecto de los conjugados de GLP-1(Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno se determinó también conjugados de estrógeno sobre la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 21 días. Los ratones que se les administró a/estrógeno conjugado GLP-1 consume menos comida que los ratones que se les administró GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) solo.

35 **[0890]** La figura 4d muestra el efecto de conjugados de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno sobre los niveles de glucosa en sangre (mg/dL). A una dosis alta, los ratones que se les administró conjugados de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno experimentaron un mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 21 que los ratones que se les administró GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) solo.

Ejemplo 16.

40 **[0891]** Los ratones (N = 8, 11 meses de edad, el peso corporal promedio 60 g) que estaban en una dieta para diabéticos durante 9 meses se inyectaron por vía subcutánea con vehículo o una de las siguientes:

- 45 (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) (40 o 400 ug/kg/día),
 (b) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) (40 o 400 micra g/kg-día),
 (c) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) (40 o 400 ug/kg-día),
 (d) GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂^a (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) (40, 400 ug/kg-día),
 50 (e) GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) (40 ug/kg-semana), o
 (f) GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰) (40 ug/kg-semana).

55 **[0892]** El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal (Figura 5a). A los ratones que se les administró una dosis alta de conjugados de GLP-1/estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal, sin embargo los ratones que se les administró la dosis diaria baja de conjugados de GLP-1/estrógeno también experimentaron una disminución significativa en el peso corporal.

60 **[0893]** También se determinó el efecto de los conjugados GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter), DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter), y GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) sobre la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 7 días. Los ratones que se les administró o bien dosis altas o bajas de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter) y GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) o la baja dosis diaria de GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰) consume la menor cantidad de comida.

65 **[0894]** La figura 5b muestra el efecto de los conjugados GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter), DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter), y GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) en el cambio de los niveles de glucosa en sangre (mg/dL). Los ratones que se les administró o bien dosis altas o bajas de GLP-1

(Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) experimentaron el mayor cambio en la glucosa en sangre, junto con la de la dosis alta de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter).

Ejemplo 17.

- 5 **[0895]** Ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO) (N = 8, promedio de peso corporal inicial = 65 g) se inyectan por vía subcutánea una vez al día durante una semana con vehículo o 40 ug/kg una de las siguientes:
- 10 (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰),
 (b) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰),
 (c) GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰),
 (d) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter),
 (e) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter),
 (f) GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter),
 (g) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster)
 15 (h) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster), o
 (i) GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster).

20 **[0896]** El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal y la masa grasa (Figuras 6a-b). Los ratones que se les administró cualquier conjugado de estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total. El análisis de la masa grasa (Figura 6b) era relativamente constante con pérdida total de peso corporal.

25 **[0897]** La Figura 6c muestra el efecto de los conjugados de GLP-1/estrógeno en el cambio de la glucosa en sangre (mg/dL). Los ratones que se administra un análogo de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (3-éter) o un análogo de conjugado de GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex)/estrógeno (17-éster) experimentó el mayor cambio en la glucosa en sangre entre los días 0 y 7.

Ejemplo 18.

- 30 **[0898]** Los ratones (N = 8, 11 meses de edad, el peso corporal promedio 60 g) que estaban en una dieta para diabéticos durante 9 meses se administraron inyecciones subcutáneas una vez al día durante una semana con vehículo o 400 ug/kg de una de las siguiente:
- 35 (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰),
 (b) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter),
 (c) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster),
 (d) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰),
 (e) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter),
 (f) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster),
 (g) GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰),
 40 (h) GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éter), o
 (i) GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (17-éster)

45 **[0899]** El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal (figura 7a). Los ratones que se administra conjugados de GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total. Los conjugados de GLP-1/estrógeno mostraron una mayor reducción de peso corporal en vivo que los correspondientes péptidos GLP-1 que no fueron conjugados a los estrógenos.

50 **[0900]** También se determinó el efecto de los conjugados de GLP-1/Estrógeno en la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 7 días. Los ratones a los que se administra el conjugado GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno consumen la menor cantidad de comida.

55 **[0901]** La figura 7b muestra el efecto de los conjugados de GLP-1/estrógeno sobre los cambios en la glucosa en sangre (mg/dL). Los ratones a los que se les administra el conjugado GLP-1 (Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno experimentaron el mayor cambio en la glucosa en sangre entre los días 0 y 7.

[0902] Ni los péptidos que contienen A22 ni los péptidos que contienen aminoácidos D mostraron bajar mucho en relación con los conjugados de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno. Adicionalmente, los coniuugados de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno eran claramente más eficaces que la forma no estrógeno del mismo péptido.

60 Ejemplo 19.

- [0903]** Los ratones (N = 8, promedio de peso corporal 55 g) se administraron inyecciones subcutáneas una vez al día durante una semana con vehículo o una de las siguientes:
- 65 (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰) (120 o 400 ug/kg-día),
 (b) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (120 o 400 ug/kg-día),
 (c) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰) (400 o 1200 micrones g/kg-día), o

(d) DGLP-1 (A¹Aib 2²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (400 o 1200 micrones g/kg-día).

[0904] El ácido que contiene péptidos D-aminoácidos eran claramente inferior en todas las medidas de eficacia en el ácido 1-amino que contiene péptidos. El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal (Figura 8a). Hubo poca diferencia aparente en el peso corporal bajar a estas dosis para los péptidos con y sin el estrógeno.

[0905] La figura 8b muestra el efecto de los diversos conjugados de GLP-1/estrógeno sobre cambios en los niveles de glucosa en sangre (mg/dl). Los ratones que se administra el conjugado de GLP-1 (Aib²E¹⁶CexK⁴⁰)/estrógeno (3-éster) experimentaron el mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 7 *in vivo*, mucho más que la los animales tratados con el mismo péptido pero sin estrógeno. Esto demostró la mejora directa de la glucosa en sangre independiente de una diferencia en el peso corporal.

[0906] La figura 8c ilustra el efecto de la administración de los GLP-1 conjugados indicados sobre el cambio en la masa grasa.

Ejemplo 20.

[0907] inducida por la dieta ratones de obesidad (DIO) (n = 8, el peso corporal promedio 61 g) se administraron inyecciones subcutáneas una vez por día para una o dos semanas con vehículo o 40, 400, 1200, o 4000 ug/kg de uno de los siguientes:

- (a) GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (40 ug/kg-día),
- (b) DGLP-1 (a¹Aib²A²²Cex K⁴⁰) (4,000 ug/kg-día),
- (c) DGLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (400, 1200, 4000 ug/kg-día),
- (d) GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰) (40 ug/kg- día),
- (e) GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (40 ug/kg-día), o
- (f) GLP-1 (Aib²E¹⁶C₂⁴ (PEG-40 kDa)Cex K⁴⁰)/colesterol (40 ug/kg-día).

[0908] El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal. Los ratones que se administra el GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado experimentó la mayor disminución en el peso corporal (Figura 9a) y la menor cantidad de masa grasa (Figura 9b).

[0909] El efecto de la GLP-1/estrógeno (3-éster) conjuga sobre la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 7 días se determinó también. Los ratones que se administra un conjugado de GLP-1 (Aib²E¹⁶Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (sin PEG) consume significativamente menos comida que los ratones que se les administró GLP-1 solo.

[0910] La figura 9c muestra el efecto de los conjugados GLP-1/estrógeno (3-éster) en el cambio de glucosa en sangre. Había una disminución clara de la glucosa dependiente de la dosis del conjugado GLP-1/estrógeno (3-éster) que contiene aminoácido d entre los días 0 y 7 y un aumento de la dosis más alta con respecto a los ratones que se les administró GLP-1 solo (Figura 9c)

Ejemplo 21.

[0911] Los ratones (N = 8, 14 meses de edad) que estaban en una dieta para diabéticos fueron inyectada por vía subcutánea una vez al día durante una semana con vehículo o una de las siguientes:

- (a) d-GLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (1,200, 4,000 ug/kg),
- (b) d-GLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) (1200, 4000 ug/kg), o
- (c) d-GLP-1 (Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) (4,000 ug/kg),

[0912] El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal (Figura 10a). Los ratones que se les administró el conjugados de GLP-1/estrógeno que contienen aminoácido d donde el estrógeno se unidos covalentemente, ya sea como una amida estable o éster que era inestable *in vivo*. Los animales tratados con el conjugado de éster inestable experimentaron la mayor disminución en el peso corporal total.

[0913] También se determinó el efecto de los conjugados de GLP-1/estrógeno sobre la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 7 días. Los ratones que se les administró el conjugado de éster inestable consumieron significativamente menos comida que los ratones que se les administró los conjugados restantes.

[0914] También se determinó el efecto de los conjugados/estrógeno de GLP-1 en el cambio en los niveles de glucosa en sangre (mg/dl). La figura 10b ilustra que los ratones administrados conjugados de GLP-1/estrógeno éster que contienen aminoácido d experimentaron un mayor cambio en los niveles de glucosa en sangre entre los días 0 y 7 que los ratones que se les administró un péptido que contiene aminoácido d comparable, pero con una conjugado de estrógeno estable.

Ejemplo 22. Ensayos de receptores in vitro de conjugados de GLP-1/estrógeno activos

[0915] Se prepararon las diluciones en serie de los compuestos siguientes:

- (i) estradiol,
- (ii) GLP-1,
- 5 (iii) un conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) activo lábil a estrógeno,
- (iv) un conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éster) activo lábil a estrógeno,
- (v) un conjugado de GLP-1/estrógeno (17-éster) activo lábil a estrógeno,
- (vi) un conjugado GLP-1/estrógeno (17-hidrazona) activo, metaestable, lábil a ácido
- 10 (vii) un conjugado de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro) activo, metaestable, lábil a la reducción de tiol y
- (viii) un conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éster, 17-OAc) activo lábil a estrógeno activado.

[0916] Actividad de GLP-1 (inducción de AMPc) - Las diluciones en serie de (ii), (iii) y (iv) se incubaron con células HEK293 co-transfectadas con el receptor de GLP-1 y el gen de luciferasa fusionado a aminoácido del elemento de respuesta de AMPc (CRE). La luminiscencia se mide después de la lisis celular y la incubación con luciferina. Los resultados, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que la conjugación de GLP-1 a un estrógeno no influye en GLP-1 actividad inherente de en el receptor de GLP-1.

[0917] Unión a GLP-1-Las diluciones en serie de (ii), (iii) y (iv) se incubaron con GLP-1 del receptor de extractos de membrana celular, [125]-GLP-1, y revestidas con aglutinina de perlas SPA antes de la medición de centelleo. Los resultados, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que la conjugación de GLP-1 a un estrógeno no influye en la unión de GLP-1 al receptor de GLP-1.

Conjugado	GLP-1 EC ₅₀ (nM)	GLP-1 IC ₅₀ (nM)
GLP-1	0,011 ± 0,002	0,381 ± 0,043
GLP-1/Estrógeno (3-éter)	0,12 ± 0,003	0,717 ± 0,135
GLP-1/Estrógeno (3-éster)	0,014 ± 0,001	0,627 ± 0,046

[0918] Actividad de estrógeno-Las diluciones en serie de (i), (iii) y (iv) se incubaron con células T47D transfectadas con el gen de la luciferasa fusionado al elemento de respuesta a estrógenos (ERE). La luminiscencia se mide después de la lisis celular y la incubación con luciferina. Los resultados, mostrados en la siguiente tabla, indican que la unión estable de estrógeno para GLP-1 reduce significativamente la actividad estrogénica intracelular de estrógeno, mientras que el conjugado lábil demuestra un alto grado de actividad estrogénica intracelular.

[0919] Unión a ER α - Las diluciones en serie de (i), (iii) y (iv) se incubaron con ER α purificada y estradiol [125]. Después de la filtración, el ligando de radio unión se cuantificó por fósforo de imágenes. Los resultados, mostrados en la siguiente tabla, indican que la unión estable de estrógeno para GLP-1 reduce significativamente la capacidad de los estrógenos para unirse al receptor de estrógeno, mientras que el conjugado lábil demuestra unión al receptor de estrógeno, que es una función de la inestabilidad del conjugado éster bajo las condiciones del bioensayo.

Conjugado	ERC α EC ₅₀ (nM)	ERC α IC ₅₀ (nM)
Estradiol	0,004 ± 0,001	12,01 ± 1,832
GLP-1/Estrógeno (3-éter)	108,2 ± 15,73	1200 ± 301,1
GLP-1/Estrógeno (3-éster)	0,013 ± 0,001	198,0 ± 16,75

[0920] Actividad de GLP-1 (inducción de AMPc) - Las diluciones en serie de (ii), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) y (viii) se incubaron con células HEK293 co transfectadas con el receptor de GLP-1 y el gen de luciferasa fusionado al elemento de respuesta AMPc (CRE). La luminiscencia se mide después de la lisis celular y la incubación con luciferina. Los, metaestables conjugados de GLP-1/estrógeno activos fueron igualmente activos en el receptor de GLP-1 (Figura 11a).

[0921] El estrógeno Actividad-Las diluciones en serie de (i), (iii), (iv), (v), (vi), (vii) y (viii) se incubaron con células T47D transfectadas con el gen de la luciferasa fusionado a el elemento de respuesta a estrógenos (ERE). La luminiscencia se mide después de la lisis celular y la incubación con luciferina. Los, metaestables conjugados de GLP-1/estrógeno activos tenían actividad variable al receptor de estrógeno (Figura 11b). Cuando estos, conjugados metaestables activos son tratados a propósito con, por ejemplo, ácido, tiol, o una enzima (por ejemplo, catepsina), los metaestables GLP-1 conjugados/estrógeno vuelven a la potencia de estrógeno casi lleno. Por lo tanto, el activo, metaestable conjugados de GLP-1/estrógeno exposición reduce la actividad estrogénica como un conjugado covalente y requieren de liberación para estar activo.

Ejemplo 23. Ensayos de receptores in vitro de conjugados de de GLP-1/estrógeno in vitro

[0922] Se prepararon las diluciones en serie de los compuestos siguientes:

- (i) inactivo GLP-1,
- (ii) un conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éter) inactivo estable a estrógeno, y

(iii) un conjugado de GLP-1/estrógeno (3-éster) inactivo lábil a estrógeno.

[0923] Actividad de GLP-1 (inducción de AMPc) - Las diluciones en serie de (i), (ii), y (iii) se incubaron con células HEK293 co-transfectadas con el receptor de GLP-1 y el gen de luciferasa fusionado al elemento de respuesta a AMPc (CRE). La luminiscencia se mide después de la lisis celular y la incubación con luciferina. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Conjugado	GLP-1 EC ₅₀ (nM)
GLP-1 activo	0,028 ± 0,001
GLP-1 inactivo (que contiene aminoácidos d)	480,5 ± 12,76
GLP-1 (que contiene aminoácido d)/Estrógeno (3-éster) inactivo	562,2 ± 26,87
GLP-1 (que contiene aminoácido d)/Estrógeno (3-éster) inactivo	418,3 ± 16,75

10 Ejemplo 24.

[0924] Ratones con obesidad inducida por la dieta (DIO) (n = 8, el peso corporal promedio 51 g) se administraron inyecciones subcutáneas una vez al día durante dos semanas con vehículo o 400 o 4000 micrones g/kg de una de las siguientes:

- 15 (a) GLP-1 (A¹Aib²E¹⁶K⁴⁰Cex) que contiene aminoácido d (4,000 ug/kg),
 (b) GLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) que contiene aminoácido d (400, 4000 ug/kg), o
 (c) GLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) que contiene aminoácido d (400, 4000 ug/kg).

20 **[0925]** El peso corporal se midió después de 15 días y se determinó el cambio en el peso corporal. Los ratones que se les administró el aminoácido d inactivo, el estrógeno lábil que contiene-GLP 1/estrógeno (3-éster) conjugado experimentó la mayor disminución en el peso corporal, con el efecto más pronunciado a una dosis alta (Figura 12a).

25 **[0926]** También se determinó el efecto de GLP-1 inactivo y los inactivos conjugados de GLP-1/Estrógeno en la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 15 días. Los ratones que se les administró el aminoácido d inactivo, el estrógeno lábil que contiene el conjugado GLP-1/estrógeno (3-éster) se consume significativamente menos comida que los ratones que se les administró inactivo GLP-1 solo o una forma inactiva, el estrógeno-estable d-amino ácido que contiene-GLP 1/estrógeno conjugado (3-éster), con el efecto más pronunciado a una dosis alta (figura 12b).

30 **[0927]** La figura 12c muestra el efecto de GLP-1 inactivo y el aminoácido d inactivo que contiene GLP-1/estrógeno conjugados en el cambio de glucosa en sangre. Una alta dosis de aminoácido d inactivo que contiene-GLP 1/estrógeno conjugado (3-éster) rebajado de glucosa en sangre entre los días 0 y 14.

35 **[0928]** El peso del hígado se midió después de 15 días y se determinó el cambio en el peso del hígado. Los ratones que se les administró el, aminoácido d inactivo estrógeno lábil que contiene-GLP 1/estrógeno conjugado (3-éster) experimentaron una mayor disminución en el peso del hígado que los ratones que se les administró el ácido que contiene GLP estrógeno-estable, inactivo-d amino -1/estrógeno (3-éster) conjugado (figura 12d).

40 **[0929]** Se midió el peso del útero después de 15 días y se determinó el cambio en el peso del útero. Los ratones que se les administró el aminoácido d inactivo, el estrógeno lábil que contiene-GLP 1/estrógeno conjugado (3-éster) experimentó un aumento significativamente mayor en peso del útero de ratones que se les administró inactivo GLP-1 solo o la inactiva, estrógeno aminoácido d estable que contiene GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado (Figura 12e).

45 Ejemplo 25.

[0930] Ratones C₅₇Bl/6 (N = 8, el peso corporal promedio 19,6 g) en una dieta estándar de pienso fueron ovariectomizadas y se deja 5 días para la recuperación antes de las inyecciones de administración subcutánea una vez por día durante 7 días con vehículo o 4000 ug/kg de uno de los siguientes:

- 50 (a) Agonista de GLP-1,
 (b) GLP-1 (a¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estróna (3-éster) que contiene aminoácido d,
 (c) GLP-1 (A¹Aib²A²²Cex K⁴⁰)/estrógeno (3-éster) que contiene aminoácido d, o
 (d) agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster).

55 **[0931]** Los ratones se sacrificaron al final del estudio y se recogieron y se pesaron los úteros.

[0932] El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal. Los ratones que se les administró el activo, el estrógeno-estable agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado experimentaron una mayor disminución en el peso corporal de ratones que se les administró el activo, agonista de GLP-1 solo

(Figura 13a), la inactivo, aminoácido d estrógeno lábil que contiene-GLP 1/estrona conjugada (3-éster), o el aminoácido d inactivo, el estrógeno-estable que contiene-GLP 1 conjugado/estrógeno (3-éster). Los ratones que se les administró el agonista de GLP-1, el conjugado inactivo, el estrógeno lábil d-amino ácido que contiene GLP-1/estrona (3-éster), y el activo, el estrógeno-estable agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado mostró una disminución de la masa grasa (Figura 13b).

[0933] También se determinó el efecto de los conjugados de GLP-1 sobre la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 7 días. Los ratones que se administra el activo, el estrógeno-estable agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado consume menos comida que los ratones que se les administró el activo, agonista de GLP-1 solo, el inactivo, aminoácido d estrógeno lábil que contiene GLP-1/estrona (3-éster) conjugado, o el aminoácido d inactivo, el estrógeno-estable que contiene GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado (Figura 13c).

[0934] La figura 13d muestra el efecto de los conjugados de GLP-1 en el cambio de glucosa en sangre. Los ratones que se les administró el, ácido inactivo estrógeno lábil inactivo d-amino que contiene-GLP 1/estrona conjugada (3-éster) o la, estrógeno conjugado activo estable agonista de GLP-1/(3-éster) experimentó una disminución de la glucosa en la sangre niveles mayores que vehículo. Los ratones que se les administró el aminoácido d inactivo, el estrógeno-estable que contiene GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado no mostró una disminución en los niveles de glucosa en sangre.

[0935] El peso del útero se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso del útero. Los ratones que se les administró el aminoácido d inactivo, el estrógeno lábil que contiene-GLP 1/estrona conjugada (3-éster) experimentó un aumento significativamente mayor en peso del útero de ratones que se les administró GLP-1 solo, el inactivo, el estrógeno-estable d-amino ácido que contiene-GLP 1/estrógeno conjugado (3-éster), o el, GLP-1/estrógeno (3-éster) conjugado estrógenos estable activa (Figura 13e).

Ejemplo 26.

[0936] Los ratones (N = 8, el peso corporal promedio 19,1 g) en una dieta estándar de pienso fueron ovariectomizados y se deja 5 días para la recuperación antes de las inyecciones de administración subcutánea una vez por día durante 7 días con vehículo o 4000 ug/kg de uno de los siguientes:

- (a) Agonista de agonista de GLP-1/estrona (3-éster),
- (b) agonista de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro),
- (c) agonista de GLP-1/estrógeno (17-hidrazona), o
- (d) agonista de GLP-1/estrógeno (17-catepsina).

[0937] Los ratones se sacrificaron al final del estudio y se recogieron y se pesaron los úteros.

[0938] El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal. Los ratones que se les administró el metaestable agonista de GLP-1/conjugados de estrógeno experimentó una mayor disminución en el peso corporal y la masa grasa que los ratones que se les administró el activo, agonista de GLP-1 solo o el activo, el estrógeno lábil agonista de GLP-1/estrona (3-éster) conjugado (Fig. Las figuras 14a y Fig. 14b). Los ratones que se les administró la enzima metaestable y conjugados de ácido lábil, agonista de GLP-1/estrógeno (17-catepsina) y agonista de GLP-1/estrógeno (17-hidrazona), respectivamente, inicialmente tenía la mayor disminución en el peso corporal, mientras el conjugado reducción lábil tiol metaestable, agonista de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro), exhibió la mayor disminución general en el peso corporal durante el estudio de 7 días.

[0939] La Figura 14C muestra el efecto de los metaestables de GLP-1 conjugados en el cambio de glucosa en sangre. Los ratones que se les administró los conjugados de reducción de tiol metaestable y lábil a ácido, agonista de GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro) y agonista de GLP-1/estrógeno (17-hidrazona), respectivamente, experimentaron una mayor disminución de los niveles de glucosa en sangre en el transcurso del estudio que el conjugado lábil de agonista de GLP-1/estrona (3-éster).

[0940] El peso del útero se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso del útero. Los ratones que se administra el conjugado GLP-1/estrona (3-éster) lábil a estrógeno experimentaron un aumento significativamente mayor en peso del útero de ratones que se les administró conjugados GLP-1/estrógeno (Figura 14d).

Ejemplo 27.

[0941] A ratones de obesidad inducida por la dieta se administraron inyecciones subcutáneas una vez al día durante dos semanas con vehículo o 40 o 400 ug/kg de una de las siguientes:

- (a) Agonista de GLP-1,
- (b) Agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster), o
- (c) Agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster).

[0942] El peso corporal se midió después de 15 días y se determinó el cambio en el peso corporal. Los ratones que se les administró conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) activo estable a estrógeno experimentaron una

disminución significativamente mayor en el peso corporal de ratones que se les administró el agonista de GLP-1 activo solo o conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) activo lábil a estrógeno (Figura 15a).

[0943] También se determinó el efecto de GLP-1 activo y los activos conjugados de GLP-1/Estrógeno en la ingesta de alimentos acumulada durante un período de 15 días. Los ratones que se les administró el conjugado agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) activo, el estrógeno-estable conjugado consumido significativamente menos comida que los ratones que se les administró el agonista de GLP-1 activo solo o el conjugado agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) activo lábil a estrógeno (Figura 15b).

10 Ejemplo 28. Análisis de estabilidad de conjugados de GLP-1/estrógeno

[0944] Los conjugados peptídicos se incubaron (1 mg/ml) en el plasma humano 100% a pH 7,4 y 37°C. Las alícuotas se retiraron y las proteínas plasmáticas se precipitaron y se extrajeron mediante microcentrifugación. Las alícuotas se analizaron por HPLC y MS, como se describe en el Ejemplo 1. Los conjugados de GLP-1/estrógeno (3-éster) estables a estrógeno activose (por ejemplo, Ejemplo 3) no mostraron ninguna liberación de estrógeno durante 72 horas, mientras que los conjugados de GLP-1/estrógeno (3-éster) lábiles de estrógeno activo (por ejemplo, ejemplo 6) mostraron una liberación de estrógeno sustancial después de 3 horas y la liberación de estrógeno completa en 6 horas (Figura 16a). El conjugado GLP-1/estrógeno (17-hidrazona) lábil en medio ácido (por ejemplo, Ejemplo 7) no mostró ninguna liberación de estrógeno en el plasma durante 48 horas a pH fisiológico, pero liberó estrógeno en 3 horas tras la exposición al ácido (pH 5,0), con la liberación de estrógeno completa en 6 horas (Figura 16B). El conjugado lábil a reducción con tiol no impedido (por ejemplo, Ejemplo 9) mostró una liberación de estrógeno sustancial después de 24 horas y la liberación de estrógeno completa en 48 horas, mientras que el conjugado lábil a la reducción de tiol impedido, GLP-1/estrógeno (17-carbamato disulfuro) (por ejemplo, Ejemplo 9), no mostró ninguna liberación de estrógeno en el plasma durante 72 horas (Figura 16C). Este conjugado lábil a la reducción de tiol de tiol impedido tampoco exhibió ninguna liberación de estrógeno a una concentración extracelular de glutatión (por ejemplo, 15 μ M), pero liberó estrógeno en 6 horas a una concentración de glutatión intracelular de 15 mM (Figura 16d). El conjugado lábil a enzimas GLP-1/estrógeno (catepsina) (por ejemplo, Ejemplo 10) no exhibió ninguna liberación de estrógeno en el plasma durante 72 horas (Figura 16e).

30 Ejemplo 29.

[0945] Los ratones de obesidad inducida por la dieta se administraron inyecciones subcutáneas una vez al día durante siete días con vehículo o 400 μ g/kg de una de las siguientes:

- (a) Agonista de GLP-1,
- (b) Agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster),
- (c) Agonista de GIP,
- (d) Agonista de GIP/estrógeno (3-éster),
- (e) Agonista de glucagón, o
- (f) Agonista de glucagón/estrógeno (3-éster).

[0946] El peso corporal se midió después de 7 días y se determinó el cambio en el peso corporal (Figura 17a). Los ratones que se administra el conjugado GLP-1agonist/estrógeno (3-éster) experimentó la mayor disminución en el peso corporal, y una disminución significativamente mayor en el peso corporal de ratones que se les administró el agonista de GLP-1 solo. Los ratones que se les administró el agonista de GIP solo y el agonista de GIP/estrógeno (3-éster) conjugado mostraron disminuciones similares en el peso corporal. Los ratones que se les administró el agonista de GIP y el conjugado de agonista GIP/estrógeno (3-éster) mostraron una mayor disminución en el peso corporal de ratones que se les administró vehículo. Los ratones que se les administró el agonista de glucagón solo y el agonista de glucagón/estrógeno (3-éster) conjugado mostró disminuciones similares en el peso corporal. La disminución en el peso corporal de ratones que se les administró el agonista de glucagón o el agonista de glucagón/estrógeno (3-éster) conjugado fue similar a la disminución en el peso corporal en los ratones que se les administró vehículo. Sin pretender estar limitados por ninguna teoría en particular, los péptidos que se dirigen a la GLP-1 muestran receptor capacidad superior para orientar estrógeno a célula (s) donde se puede hacer una diferencia significativa en el peso corporal. En este experimento, los conjugados de GLP-1 péptidos activos (agonista de GLP-1s) obtuvieron mejores resultados con respecto a la reducción de peso corporal que los péptidos que se dirigen principalmente los receptores de GIP o de glucagón (agonistas o agonistas de GIP glucagón).

[0947] También se determinó el efecto de los conjugados en la ingesta de alimentos acumulativa (Figura 17b). Los ratones que se les administró los conjugados de estrógeno de GLP-1, GIP, y el glucagón consumieron menos comida que los ratones que se les administró el agonista de GLP-1, GIP agonista o antagonista del glucagón, respectivamente. Los ratones que se administra el conjugado agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster) consume la menor cantidad de alimento durante el período de 7 días.

[0948] También se determinó el efecto de los conjugados sobre el cambio en la glucosa en sangre. Los ratones que se les administró el agonista de GLP-1 y el agonista/estrógeno (3-éster) conjugado tanto GLP-1 mostró una disminución en los niveles de glucosa en sangre durante 7 días, con la disminución mayor en los ratones que se les administró el conjugado. Los ratones que se les administró el agonista de GIP y el conjugado agonista de

GIP/estrógeno (3-éter) también mostraron una disminución en los niveles de glucosa en sangre durante 7 días. Los ratones que se les administró el antagonista del glucagón mostró un aumento en los niveles de glucosa en sangre durante 7 días, mientras que los ratones que se les administró el conjugado de agonista de glucagón/estrógeno (3-éter) mostraron una disminución en los niveles de glucosa en sangre durante 7 días (Figura 17c) .

5

Ejemplo 30

[0949] Ratones de tipo natural con la obesidad inducida por la dieta, ratones con receptor de estrógeno beta knockout (ER β KO) y ratones con receptor alfa de estrógeno knock-out (ER α KO) se administraron inyecciones subcutáneas una vez al día durante dos semanas con vehículo o 400 ug/kg de una de las siguientes:

10

- (a) Agonista de GLP-1, o
- (b) Agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter).

[0950] El peso corporal se midió después de 14 días y se determinó el cambio en el peso corporal (Figura 18a). Ratones de tipo natural que se les administró el conjugado agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) mostraron una mayor disminución en el peso corporal durante los ratones que se les administró vehículo o el agonista de GLP-1. Ratones de tipo natural que se les administró vehículo mostraron un aumento de aproximadamente 10% en el peso corporal durante el período de dos semanas, un aumento de aproximadamente 3% en el peso corporal cuando se administra el agonista de GLP-1, y aproximadamente un 10% de disminución en el peso corporal cuando se administra conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter). Ratones KO ER α que se les administró el conjugado agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) mostraron una mayor disminución en el peso corporal que cuando se administró vehículo o el agonista de GLP-1. Ratones ER α KO no mostró ningún cambio en el peso corporal cuando se administra vehículo, aproximadamente un 10% de disminución en el peso corporal cuando se administra el agonista de GLP-1, y aproximadamente un 20% de disminución en el peso corporal cuando se administra el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter). Ratones ER β KO que se les administró el conjugado agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) mostraron una disminución similar en el peso corporal de ratones que se les administró el agonista de GLP-1. Ratones ER β KO mostraron una disminución del 2% en el peso corporal cuando se administra vehículo, y aproximadamente un 15% de disminución en el peso corporal cuando se administra ya sea el agonista de GLP-1 o el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter). Sin pretender estar limitados por ninguna teoría particular, estos datos sugieren que el receptor ER β es responsable de la reducción de un adicional de peso corporal. Cuando el receptor ER β es eliminado, los ratones no muestran una diferencia en el peso corporal bajar entre el agonista de GLP-1 y el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter).

15

20

25

30

[0951] También se determinó el efecto de los conjugados de GLP-1 en la ingesta de alimentos acumulada en los ratones de tipo natural y los ratones knock-out (Figura 18b). Los ratones knock-out a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) consumió la menor cantidad de comida.

35

[0952] También se determinó el efecto de los conjugados de GLP-1 en el cambio de glucosa en sangre en los ratones de tipo natural y ratones knock. A los ratones KO ER α que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter) mostraron la mayor disminución de los niveles de glucosa en sangre (Figura 18c).

40

Ejemplo 31

[0953] A ratones db/db macho con niveles de glucosa en sangre de 500 mg/dl se les administró una dosis subcutánea de vehículo o 50 nmol/kg de uno de los siguientes:

45

- (a) agonista de GLP-1,
- (b) agonista de GLP-1/estrógeno (3-éter), o
- (c) agonista de GLP-1/estrógeno (3-éster).

[0954] Los ratones a los que se les administró el agonista de GLP-1 mostraron la disminución menos eficaz de glucosa en sangre durante 48 horas (excepto para el vehículo), mientras que los ratones a los que se les administró el conjugado de agonista de GLP-1 estable con estrógeno/estrógeno (3-éter) mostraron la disminución más eficaz de la glucosa en sangre durante 48 horas (figura 19).

50

[0955] Los resultados de los experimentos anteriores fueron consistentes cuando se utilizó un modelo de diabetes inducida con estreptozotocina (STZ), un modelo de diabetes de tipo I.

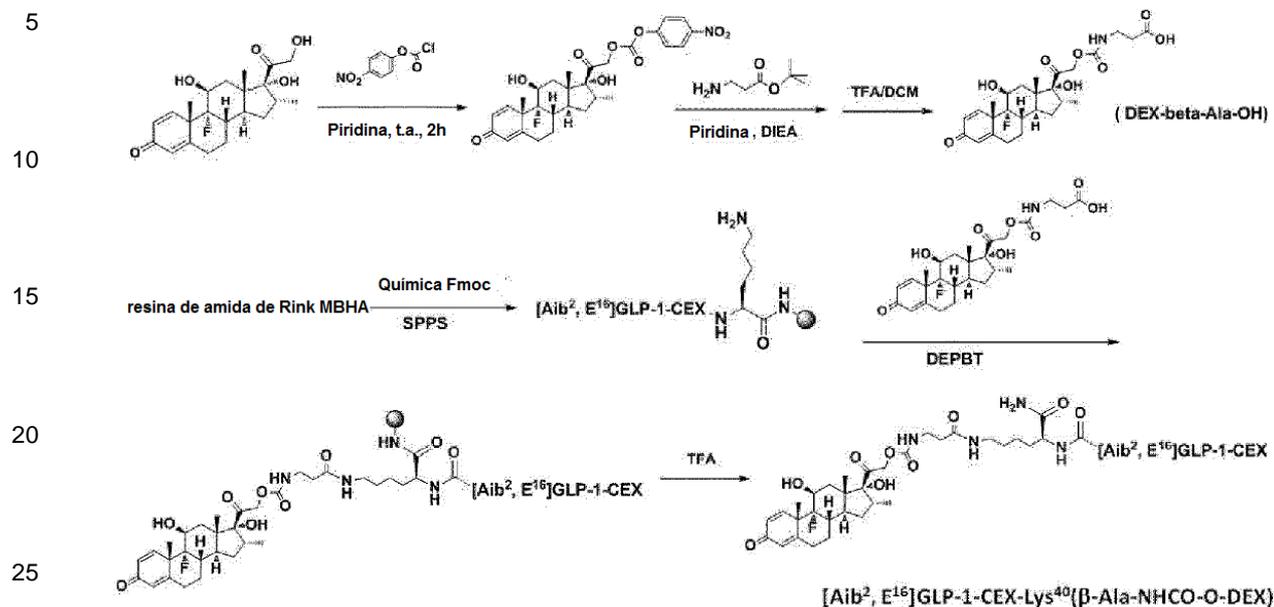
55

Ejemplo 32: Conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona con carbamato β -alanina

[0956] Este ejemplo demuestra un acoplamiento en fase sólida de la dexametasona a un agonista de GLP-1 con un enlazador carbamato β -alanina, tal como se muestra a continuación y en la Figura 20.

60

65

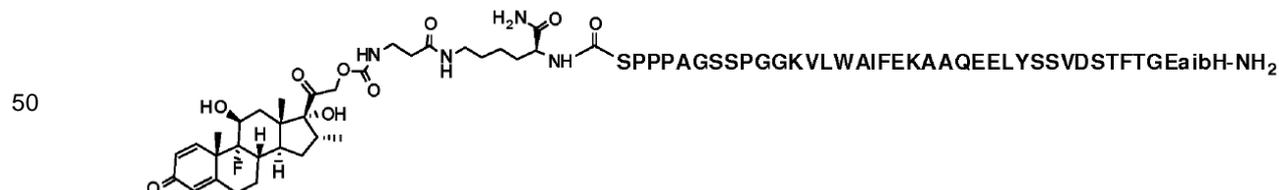


30

[0957] La dexametasona se acopló con cloroformiato de 4-nitrofenilo en piridina para dar la [21-(4-nitrofenilformiato)] dexametasona. La [21-(4-nitrofenilformiato)]dexametasona se acopló directamente con el éster terc-butílico de β-alanina sin purificación intermedia para obtener [21-(N-carbonil-β-alanina terc-butil éster)] dexametasona. La [21-(N-carbonil-β-alanina terc-butil éster)] dexametasona se trató a continuación con 70% de TFA en diclorometano (DCM) para obtener la [21-(N-carbonil-β-alanina)] dexametasona, que tenía un peso molecular de 508,2 (M + H⁺) (determinado por ESI-MS).

35

[0958] La resina peptidil compuesta de una secuencia de análogo de GLP-1 (HaibEGTFTSDVSSYLEEQAQAEFIWLVKGGPSSGAPPPSK) se sintetizó mediante química de Fmoc usando una resina de amida de Rink MBHA. El residuo Lys C-terminal se acopló como Fmoc-Lys-OH (MTT). Después de retirar Mtt con 1% de TFA/Tis/DCM, la resina de peptidilo se acopló con [21-(N-carbonil-β-alanina)] dexametasona utilizando DEPBT en DMF/DIEA. El conjugado de péptido y dexametasona se escindió de la resina usando un cóctel de escisión que consistía en 85% de TFA, 5% de fenol, 5% de agua y 5% de Tis. El conjugado de péptido se purificó mediante RP-HPLC con TFA al 0,1%/acetonitrilo/agua. El conjugado de análogo de GLP-1 y dexametasona purificado se analizó por RP-HPLC analítica y se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF, con el peso molecular de 4680,5 (correspondiente al PM calculado de 4680,0). El conjugado de péptido resultante tenía 40 aminoácidos, un peso molecular de 4.680, y un pI teórico de 4,96 (representado a continuación y en la figura 21).

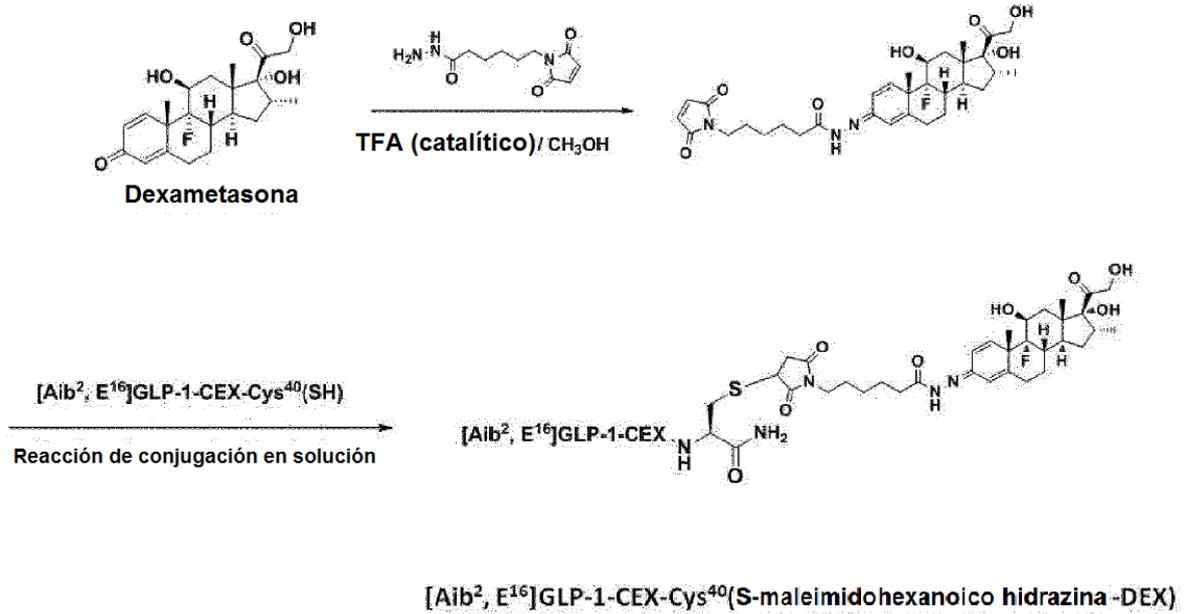


Ejemplo 33: Conjugado de agonista de GLP-1/hidracina de dexametasona

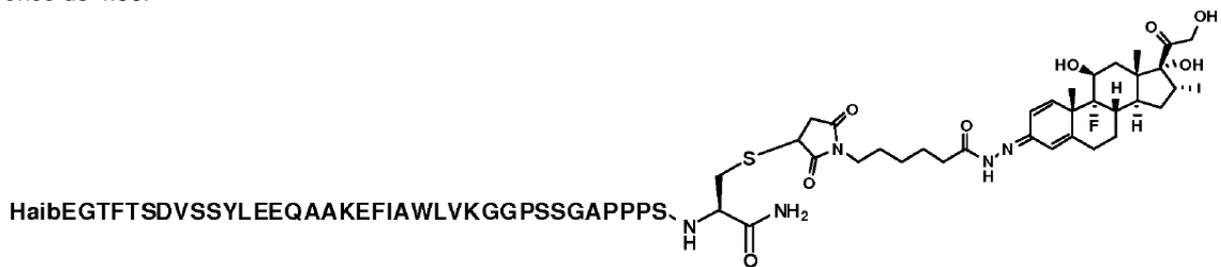
60

[0959] La dexametasona se hizo reaccionar con monohidrato de hidrazida del ácido maleimidocaproico en TFA al 1%/metanol para obtener la [3-(hidrazida del ácido maleimidocaproico)-ilideno]dexametasona de peso molecular de 600,3 (M-H⁺) en ESI-MS, tal como se muestra a continuación y en la figura 22.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65



[0960] Una secuencia de análogo de GLP-1 que poseía un único tiol libre se sintetizó mediante química de Fmoc sobre resina de amida de Rink MBHA (HaibEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGPSSGAPPPS). La alquilación de tiol-maleimido del péptido análogo de GLP-1 con [hidrazida de ácido maleimidocaproico 3-ilidn] dexametasona (1,5 veces en exceso) se realizó en solución acuosa de acetonitrilo al 50% con 1 M de base Tris ajustado a pH 8. Se purificó el conjugado de péptido por RP-HPLC con TFA al 0,1%/acetonitrilo/agua. El conjugado de análogo de GLP-1 y dexametasona purificado se analizó por RP-HPLC analítica y se caracterizó por ESI-MS. El peso molecular del conjugado fue de 4764 ± 1,5, que corresponde al PM calculado de 4766,5. El conjugado de péptido resultante se muestra a continuación y en la Figura 23. El péptido tenía 40 aminoácidos, un peso molecular de 4.766, y un pI teórico de 4.96.

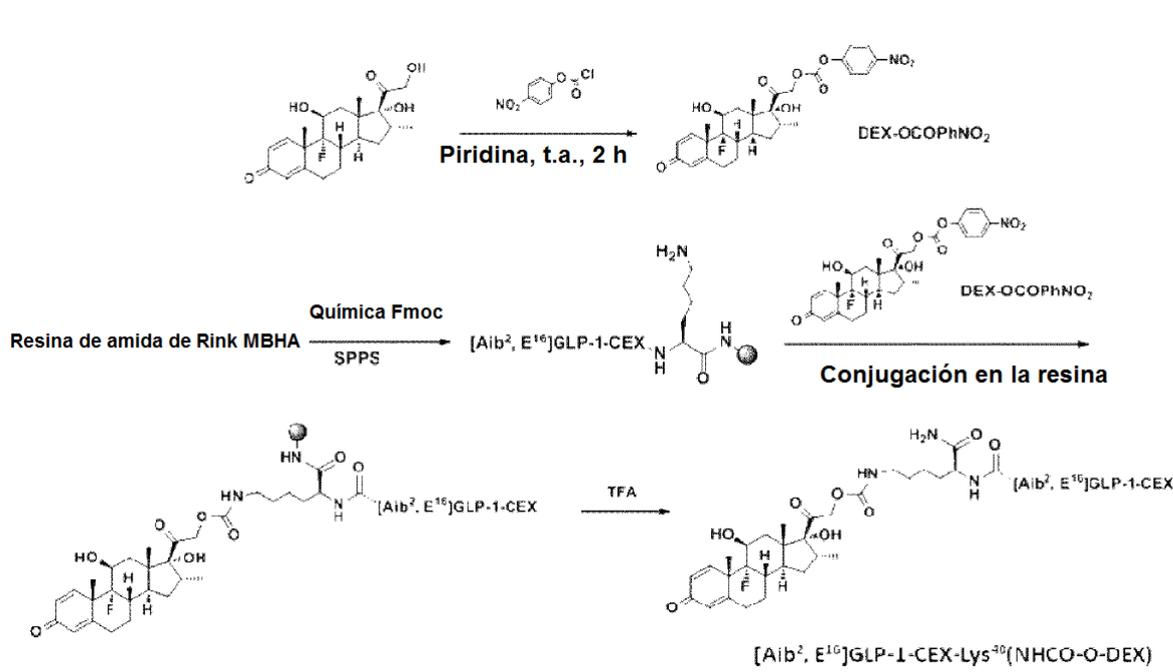


Ejemplo 34

[0961] Las actividades de los conjugados de péptidos de los Ejemplos 32 y 33 en el receptor de glucocorticoides se ensayaron en el ensayo de gen indicador de luciferasa usando dos clones de células HeLa (ATCC # CCL-2) transfectados con luciferasa de luciérnaga impulsada por la repetición larga terminal de virus de tumor mamario murino. Los resultados se muestran en la figura 24. Ambos conjugados retenían una cantidad significativa de la actividad agonista en el receptor de glucocorticoides en ambos clones informadores, aunque no hasta el grado de dexametasona no conjugada. Este ejemplo ilustra que la dexametasona se puede conjugar a un análogo de GLP-1 y puede retener un grado significativo de actividad agonista en el receptor de glucocorticoides.

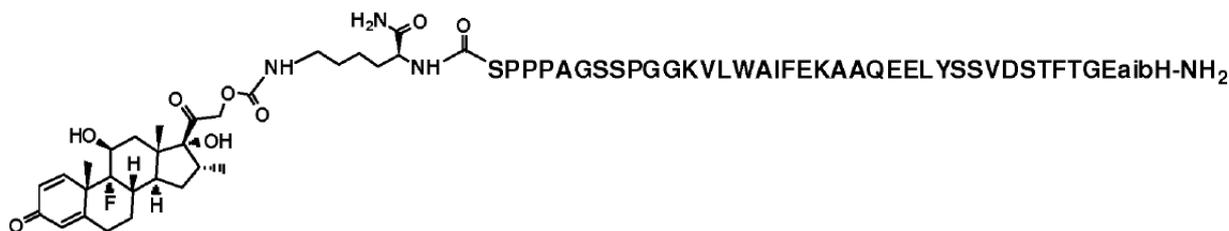
Ejemplo 35: Conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona con carbamato

[0962] Este ejemplo demuestra un acoplamiento en fase sólida de dexametasona a un péptido agonista de GLP-1 con un enlazador carbamato, tal como se representa a continuación.



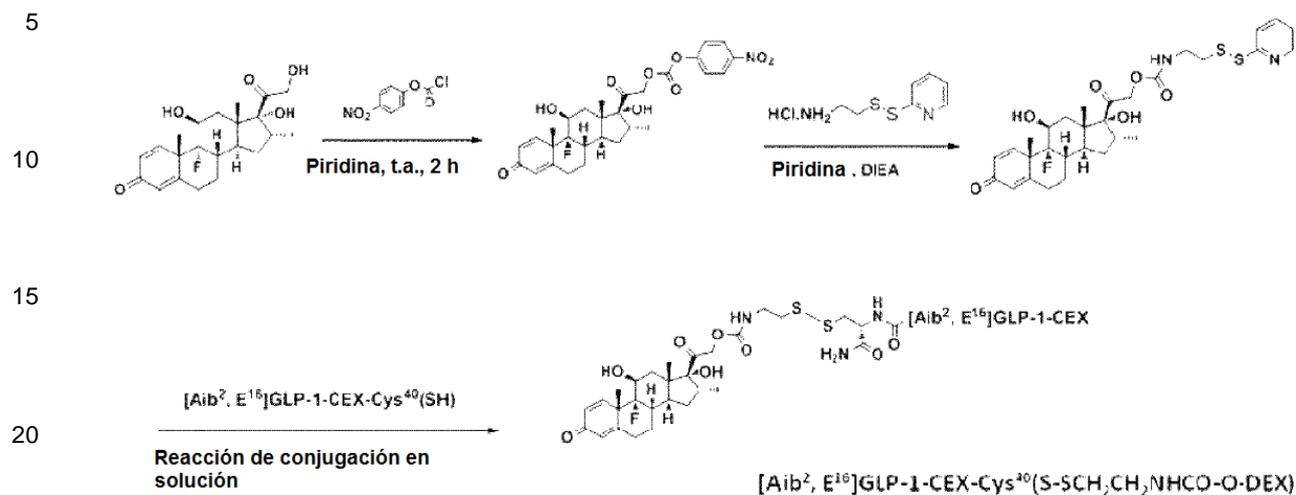
[0963] La dexametasona se acopló con cloroformiato de 4-nitrofenilo en piridina con DMAP catalítico en 2 horas a temperatura ambiente para dar [21-(4-nitrofenilformiato)]dexametasona. La [21-(4-nitrofenilformiato)]dexametasona se acopló directamente con la resina de peptidil sin purificación.

[0964] La resina de peptidilo compuesta de una secuencia de análogo de GLP-1 (HaibEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLVKGGPSSGAPPSK) se sintetizó mediante química de Fmoc usando una resina de amida de Rink MBHA. El residuo de Lys C-terminal se acopló como Fmoc-Lys-OH (MTT). Después de retirar Mtt con 1% de TFA/Tis/DCM, la resina de peptidilo se acopló con [21-(4-nitrofenilformiato)]dexametasona en piridina/DMF durante aproximadamente 16 horas. El conjugado de péptido y dexametasona se escindió de la resina usando una cóctel de escisión que consistía en 85% de TFA, 5% de fenol, 5% de agua y 5% de Tis. El conjugado de péptido se purificó mediante RP-HPLC con eluyente de TFA al 0,1%/acetonitrilo/agua. El conjugado de análogo de GLP-1 y dexametasona purificado se analizó por RP-HPLC analítica y se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-TOF. El conjugado de péptido tenía un peso molecular de 4.608,2, que corresponde al PM calculado 4609,0. El conjugado de agonista de GLP-1/dexametasona con carbamato se representa a continuación.



Ejemplo 36: Conjugados de agonista de GLP-1/dexametasona con disulfuro

[0965] Este ejemplo demuestra un procedimiento de conjugación de dexametasona a un péptido agonista de GLP-1 a través de un enlazador disulfuro, tal como se muestra a continuación.



25 **[0966]** La dexametasona se acopló con cloroformiato de 4-nitrofenilo en piridina para dar la [21-(4-nitrofenilformiato)]
 dexametasona. La [21-(4-nitrofenilformiato)]dexametasona se acopló directamente con el clorhidrato de 2-(2-
 piridilditio)etilamina en piridina/DIEA, sin purificación intermedia, para obtener la [21-(N-carbonil-2-(2-piridilditio)
 30 etilamina]dexametasona. El tampón de reacción se diluyó con AcOH al 10%/ACN al 10% y se inyecta en una
 columna de fase inversa C₈ para purificar el producto por el disolvente 0,1% de TFA/acetonitrilo/agua. El producto
 purificado de [21-(N-carbonil-2-(2-piridilditio)etilamina]dexametasona se caracterizó por ESI-MS. El producto tenía un
 peso molecular de 605,22 (M + H)⁺, que corresponde a un PM calculado de 604,75.

35 **[0967]** Una secuencia de análogo de GLP-1 que poseía un único tiol libre se sintetizó mediante química de Fmoc
 sobre resina de amida de Rink MBHA (HaibEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGPSSGAPPPSC). Para el
 procedimiento de formación de disulfuro entre el péptido de tiol y el intermedio de dexametasona, el péptido de tiol
 se disolvió en solución acuosa de acetonitrilo al 70% con 1 M de base Tris base ajustada a pH 8, se mezcló con un
 exceso de 2 veces de [21-(N-carbonil-2-(2-piridilditio)etilamina]dexametasona disuelta en DMF, y se agitó a
 temperatura ambiente durante aproximadamente 4 h. El tampón de reacción se diluyó con AcOH al 10%/ACN al
 40 10% y se purificó por RP-HPLC con eluyente de TFA al 0,1%/acetonitrilo/agua. El conjugado de análogo de GLP-1 y
 dexametasona purificado se analizó por RP-HPLC analítica y se caracterizó por espectrometría de masas MALDI-
 TOF. El conjugado tenía un peso molecular de 4.658,1, que corresponde a un PM calculado de 4658,5.

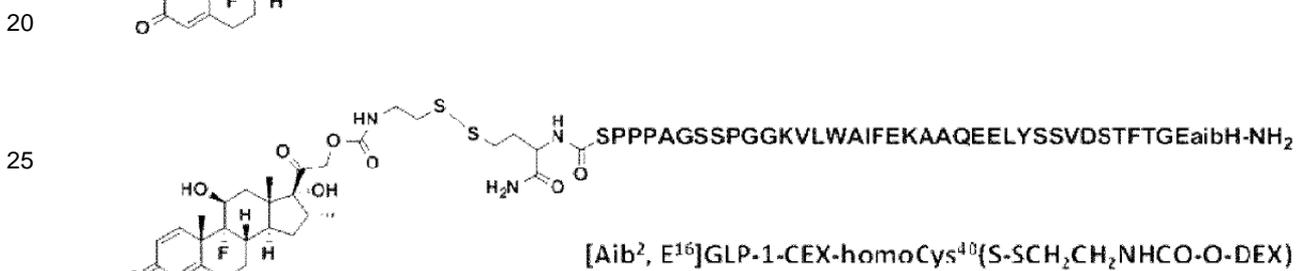
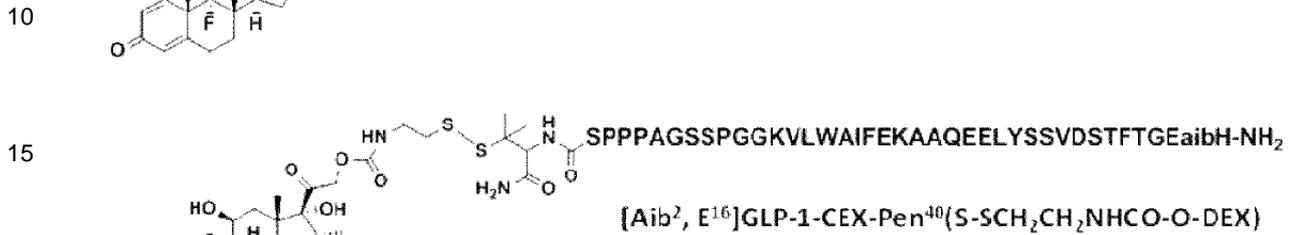
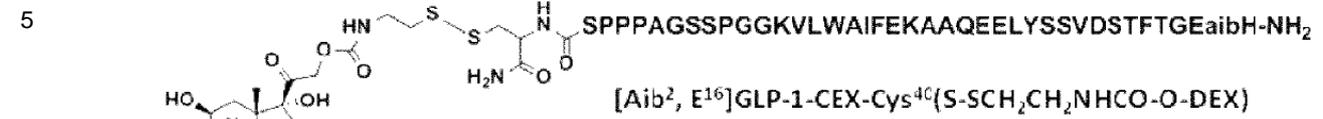
45 **[0968]** Otros conjugados con enlazador disulfuro, tales como [Aib², E¹⁶]GLP-1-CEX-homoCys⁴⁰ (S-
 SCH₂CH₂NHCO-O-DEX) y [Aib², E¹⁶]GLP-1-CEX-Pen⁴⁰ (S-SCH₂CH₂NHCO-O-DEX), fueron sintetizados como
 se ha descrito anteriormente. Sin embargo, en lugar de utilizar un péptido GLP-1 con un tiol libre individual, se utilizó
 un péptido que tenía homocisteína y penicilamina en la posición 40.

50 **[0969]** Los conjugados de agonista de GLP-1/dexametasona de ejemplo con tres diferentes tipos de enlazadores
 disulfuro (cisteína, penicilamina, homocisteína y) se representan a continuación.

55

60

65



20

25

30

Ejemplo 37

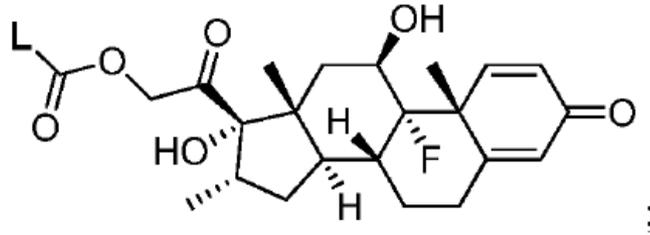
35 [0970] Las actividades de los conjugados de péptidos de los Ejemplos 35 y 36 en el receptor de GLP-1 y en el receptor de glucocorticoides se ensayaron en el ensayo de gen indicador de luciferasa usando dos clones de células HeLa (ATCC # CCL-2) transfectados con luciferasa de luciérnaga impulsada por la repetición larga terminal de virus de tumor mamario murino, tal como se describe en el Ejemplo 34. Los resultados se muestran en las figuras 25 y 26.

40 [0971] Todos los conjugados retuvieron una cantidad significativa de la actividad agonista en el receptor de glucocorticoides en ambos clones informadores, aunque no hasta el grado de dexametasona no conjugada. De los conjugados ensayados, el conjugado [Aib², E¹⁶] GLP-1-CEX-Lys⁴⁰ (NHCO-O-DEX) retuvo la mayor cantidad de actividad en el receptor de glucocorticoides. El péptido [Aib², E¹⁶] GLP-1-CEX-homoCys⁴⁰ (S-SCH₂CH₂NHCO-O-DEX) se espera que tenga actividad agonista del receptor de GLP-1 similar en comparación con los otros péptidos probados. Este ejemplo ilustra que la dexametasona se puede conjugar a un análogo de GLP-1 y puede retener un

45 grado significativo de actividad agonista en el receptor de glucocorticoides.

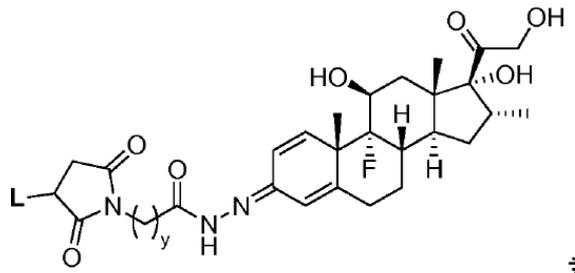
REIVINDICACIONES

1. Compuesto que comprende la estructura **Q-L-Y**;
 en el que **Q** es un péptido de la superfamilia del glucagón; y
 en el que **L-Y** comprende la estructura (I):

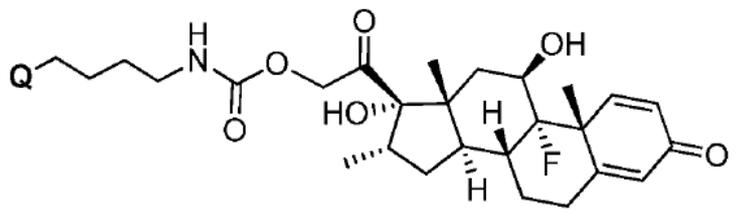


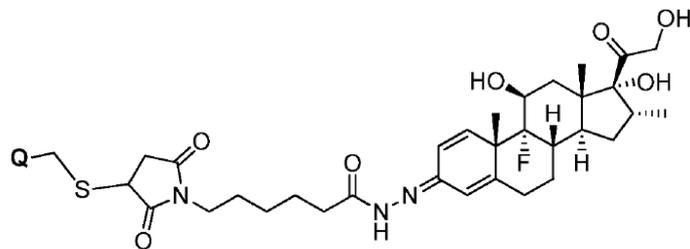
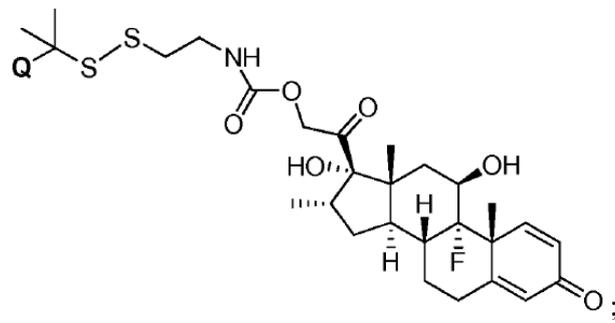
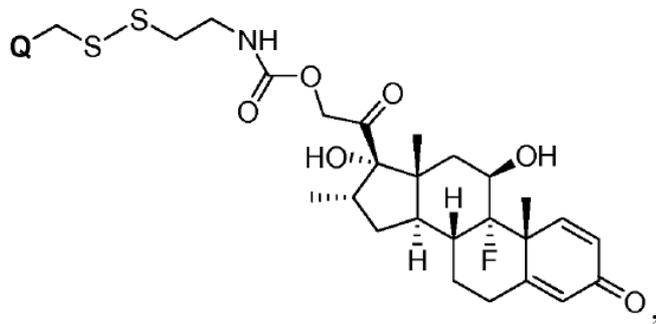
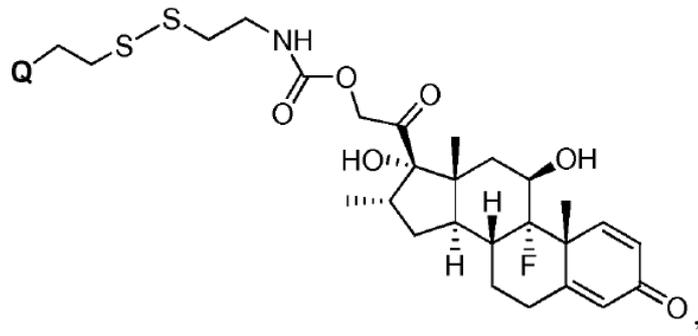
en la que
L está unido a una cadena lateral que contiene amino o tiol de un aminoácido de **Q** correspondiente a la posición 40 de un análogo de glucagón natural modificado para comprender una extensión C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1610), en el que dicha extensión C-terminal representa las posiciones de aminoácidos 30-39; o

(II):



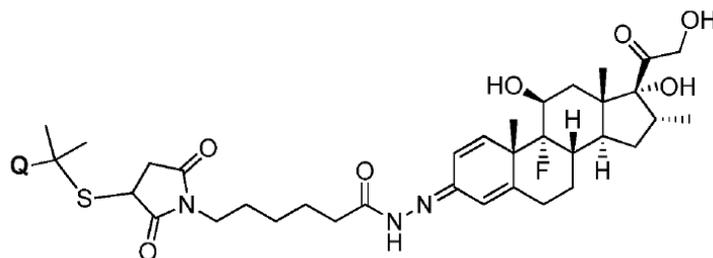
en la que
L está unido a una cadena lateral que contiene tiol de un aminoácido de **Q** correspondiente a la posición 40 de un análogo de glucagón natural modificado para comprender una extensión C-terminal de GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1610), en el que dicha extensión C-terminal representa las posiciones de aminoácidos 30-39, e y es alquileo C₁-C₁₀, y dicho compuesto comprende la estructura





5

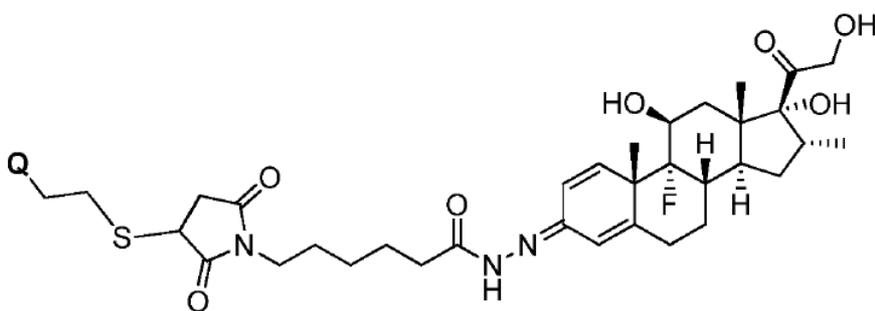
10



15 o

20

25



30 2. Compuesto, según la reivindicación 1, en el que Q 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 en la misma,

35

(a) en la que X₁ y/o X₂ es un aminoácido no natural (en relación a la SEQ ID NO: 1601) que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),

(b) en la que Z es GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 1610);

(c) en la que dichas 1 a 3 modificaciones de aminoácidos comprenden una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

40

(i) un puente de lactama entre las cadenas laterales de los aminoácidos en las posiciones i e i + 4, en las que i es 12, 16, 20 o 24, y

(ii) uno, dos o tres de los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21, y 24 del péptido de glucagón están sustituidos por un aminoácido α,α -disustituido; en el que Q muestra actividad agonista del glucagón; o

45

(II) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1601 modificada para comprender:

(a) al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:

50

(i) sustitución de Thr en la posición 29 por un aminoácido cargado;

(ii) sustitución de Thr en la posición 29 por un aminoácido cargado seleccionado del grupo que consiste en Lys, Arg, His, Asp, Glu, ácido cisteico, y ácido homocisteico;

(iii) sustitución en la posición 29 por Asp, Glu o Lys;

(iv) sustitución en la posición 29 por Glu;

(v) inserción después de la posición 29 de 1 a 3 aminoácidos cargados;

(vi) inserción después de la posición 29 de Glu o Lys;

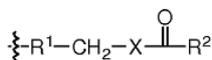
55

(vii) inserción después de la posición 29 de Gly-Lys o Lys-Lys;

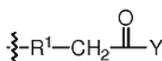
(viii) sustitución de Gln en la posición 3 por un aminoácido que comprende una cadena lateral de estructura I, II, o III:

60

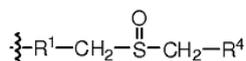
65



Estructura I



Estructura II



Estructura III

en las que R¹ es alquilo C₀₋₃ o heteroalquilo C₀₋₃; R² es NHR⁴ o alquilo C₁₋₃; R³ es alquilo C₁₋₃; R⁴ es H o alquilo C₁₋₃; X es NH, O, o S; e Y es NHR⁴, SR³ u OR³; y (ix) una combinación de las mismas;

(b) sustitución de Ser en la posición 16 por Thr, Glu o Aib; y al menos una modificación de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) sustitución de His en la posición 1 por un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
- (ii) sustitución de Ser en la posición 2 por un aminoácido no natural que reduce la susceptibilidad del péptido de glucagón a la escisión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV),
- (iii) sustitución de Thr en la posición 7 por Ile, Abu o Val;
- (iv) sustitución de Gln en la posición 20 por Ser, Thr, Ala, Aib, Arg o Lys;
- (v) sustitución de Met en la posición 27 por Leu o Nle;
- (vi) delección de los aminoácidos en las posiciones 28-29;
- (vii) delección del aminoácido en la posición 29;
- (viii) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPS al extremo C-terminal; y
- (ix) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPSX al extremo C-terminal, en el que X es cualquier aminoácido; y
- (x) una combinación de las mismas;

en el que Q muestra actividad agonista del glucagón;

o

(III) un péptido relacionado con glucagón de la SEQ ID NO: 1601, con las siguientes modificaciones:

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

(b) una modificación seleccionada del grupo que consiste en:

- (i) 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, en las que i es 12, 13, 16, 17, 20 o 24, y en las que j es 17, y
- (ii) uno, dos, tres, o todos los aminoácidos en las posiciones 16, 20, 21, y 24 del análogo están sustituidos por un aminoácido α, α-disustituido,

(c) 1-10 modificaciones adicionales de aminoácidos; opcionalmente modificaciones adicionales en las que Q muestra actividad en el receptor de GIP;

opcionalmente en el que las 1-10 modificaciones adicionales de aminoácidos se seleccionan del grupo que consiste en:

- (1) sustitución de serina en la posición 2 por D-Ser, Ala, D-Ala, Gly, N-metil-Ser, Aib, Val o ácido ε-amino-N-butírico;
- (2) sustitución de serina en la posición 16 por Glu, Gln, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, Thr, Gly, o Aib;
- (3) sustitución de glutamina en la posición 20 por Ser, Thr, Ala, Lys, citrulina, Arg, Orn, o Aib;
- (4) sustitución de metionina en la posición 27 por Leu;
- (5) sustitución de arginina en la posición 28 por Ala;
- (6) sustitución de treonina en la posición 29 por Gly;
- (7) una sustitución conservativa en cualquiera de las posiciones 2, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 24, 27, 28, y 29;
- (8) adición de 1-21 aminoácidos al extremo C-terminal
- (9) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPS al extremo C-terminal,
- (10) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPSX al extremo C-terminal, en el que X es cualquier aminoácido,
- (11) sustitución del grupo carboxilo C-terminal por una amida o éster carboxílico, y

(12) una combinación de las mismas; o

(IV) la secuencia de aminoácidos

X₁-X₂-Gln-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-X₃-Ser-X₄-Tyr-Leu-X₅-X₆-X₇-X₈-Ala-X₉-X₁₀-Phe-X₁₁-X₁₂-Trp-Leu-X₁₃-X₁₄-X₁₅ (SEQ ID NO: 55), o un análogo de la misma, en el que dicho análogo difiere de la SEQ ID NO: 55 en 1 a 3 modificaciones de aminoácidos, seleccionadas de las posiciones 1, 2, 3, 5, 7, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 19, 21 y 25, en la que:

(a) X₁ es His, D-His, (Des-amino)His, hidroxil-His, acetyl-His, homo-His, o ácido alfa, alfa-dimetil imidazol acético (DMIA), N-metil His, alfa-metil His, o ácido imidazol acético;

(b) X₂ es Ser, D-Ser, Ala, D-Ala, Val, Gly, N-metil Ser, ácido aminoisobutírico (Aib) o N-metil Ala;

(c) X₃, X₄, X₅, X₁₀, X₁₁, y X₁₄ son, individualmente, cualquier aminoácido;

(d) X₆ es Ser, Glu, Gln, ácido homoglutámico o ácido homocisteico;

(e) X₇ es Arg, Gln, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina;

(f) X₈ es Arg, Ala, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina;

(g) X₉ es Gln, Lys, Arg, Orn o citrulina;

(h) X₁₂ es Ala, Gln, Glu, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina;

(i) X₁₃ es Met, Leu o Nle;

(j) X₁₅ es Thr, Gly, Lys, Cys, Orn, homocisteína o acetyl fenilalanina; y comprende una de las siguientes modificaciones:

(1) deleción de los aminoácidos en las posiciones 28-29;

(2) deleción del aminoácido en la posición 29;

(3) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPS al extremo C-terminal; y

(4) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPSX al extremo C-terminal, en el que X es cualquier aminoácido; y

(5) una combinación de las mismas; o

(V) una secuencia de aminoácidos que difiere de SEQ ID NO: 1601 en no más de diez modificaciones de aminoácidos, que comprende:

(a) una o más sustituciones de aminoácidos por Aib en las posiciones 16, 20, 21, y/o 24, y

(b) una modificación de aminoácido en la posición 1 y/o 2 que proporciona una susceptibilidad reducida a la escisión por la dipeptidil peptidasa IV, y que comprende una o más de las siguientes modificaciones:

(a) deleción de los aminoácidos en las posiciones 28 y 29,

(b) deleción del aminoácido en la posición 29,

(c) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPS al extremo C-terminal,

(d) adición de la secuencia de aminoácidos GPSSGAPPPSX al extremo C-terminal, en el que X es cualquier aminoácido,

(e) sustitución del grupo carboxilo C-terminal por una amida o éster carboxílico, y

en el que **Q** muestra actividad agonista de GLP-1 y actividad agonista de glucagón.

3. Compuesto, según la reivindicación 2, en el que **Q** comprende la secuencia [Aib², E¹⁶]GLP-1-CEX-Lys⁴⁰(NHCO-O-DEX) o [Aib², E¹⁶]GLP-1-CEX-Cys⁴⁰(S-SCH₂CH₂NHCO-O-DEX).

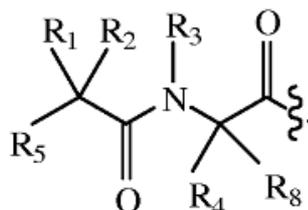
4. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende, además, la estructura **A-B**, en la que

a) **A** es un aminoácido o un hidroxiaácido;

b) **B** es un aminoácido N-alquilado unido a **Q** a través de un enlace amida entre un resto carboxilo de **B** y una amina de **Q**;

c) **A**, **B**, o el aminoácido de **Q** al que está unido **A-B** es un aminoácido no codificado, en el que además la semivida de escisión química (t_{1/2}) de **A-B** de **Q** es de al menos aproximadamente 1 hora a aproximadamente 1 semana en PBS en condiciones fisiológicas;

opcionalmente en el que **A-B** comprende la estructura:



en la que

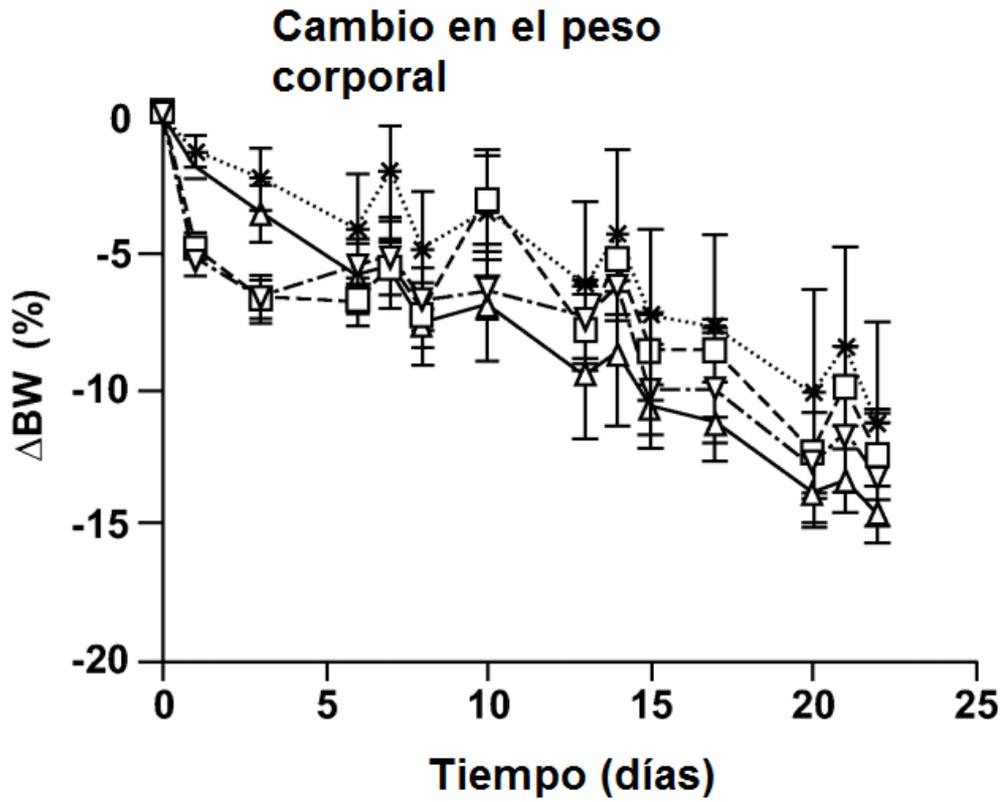
(a) R¹, R², R⁴ y R⁸ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₁₈, alqueno C₂-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)SH, (alquil C₂-C₃)SCH₃, (alquil C₁-C₄)CONH₂, (alquil C₁-C₄)COOH, (alquil C₁-C₄)NH₂, (alquil C₁-C₄)NHC(NH₂⁺)NH₂, (alquil C₀-C₄) (cicloalquilo C₃-C₆), (alquil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

- C₄) (aril C₆-C₁₀)R⁷, (alquil C₁-C₄)(heteroarilo C₃-C₉) y alquil C₁-C₁₂(W1)alquilo C₁-C₁₂, en la que W1 es un heteroátomo seleccionado del grupo que consiste en N, S y O, o
- (i) R¹ y R² junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₁₂ o arilo; o
- (ii) R⁴ y R⁸ junto con los átomos a los que están unidos forman un cicloalquilo C₃-C₆;
- 5 (b) R³ se selecciona del grupo que consiste en alquilo C₁-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)NH₂, (alquil C₁-C₁₈)SH, (alquil C₀-C₄) cicloalquilo (C₃-C₆), (alquil C₀-C₄) (heterocíclico C₂-C₅), (alquil C₀-C₄) (arilo C₆-C₁₀)R⁷ y (alquil 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;
- (c) R⁵ es NHR⁶ u OH;
- 10 (d) R⁶ es H, alquilo C₁-C₈ o R⁶ y R² junto con los átomos a los que están unidos forman un anillo heterocíclico de 4, 5 ó 6 miembros; y
- (e) R⁷ se selecciona del grupo que consiste en H y OH.
5. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-4,
- 15 (I) que comprende además una cadena lateral de aminoácido en **Q** unida covalentemente a un grupo acilo o a un grupo alquilo a través de una unión alquil amina, amida, éter, éster, tioéter o tioéster, cuyo grupo acilo o grupo alquilo no es natural a un aminoácido de origen natural;
- opcionalmente en el que el aminoácido al que está unido el grupo acilo o alquilo está en una posición correspondiente a la posición 10, 20, 24, 30, 37, 38, 39, 40, 41, 32, o 43 de una secuencia que comprende el
- 20 glucagón natural, o el aminoácido C-terminal;
- opcionalmente en el que el grupo acilo o el grupo alquilo están unidos a la cadena lateral del aminoácido a través de un espaciador; o
- (II) en el que **Q** está unido covalentemente a uno o más restos heterólogos.
- 25 6. Compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que **Q** se selecciona del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 1-564, 566-570, 573-575, 577, 579-580, 585-612, 616, 618-632, 634-642, 647, 657-692, 694-695, 715-718, 722, 724-725, 729, 731-760, 801-878, 883-919, 1001-1275, 1301-1371, 1401-1518 y 1601-1650.
7. Composición farmacéutica que comprende el compuesto, según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, y un
- 30 portador farmacéuticamente aceptable.
8. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7, para usar en el tratamiento de una enfermedad o afección médica en un paciente, en la que la enfermedad o afección médica se selecciona del grupo que consiste en síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa.
- 35

Alineación de las secuencias de aminoácidos y péptidos de la superfamilia de glucagón

GHRH	YADAIFTNSYRKVLGQLSARKLLQDIMSRL	29
PHI	HADGVFTSDPSKLLGQLSAKKYLESLM	27
VIP	HSDAVTTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN	28
PACAP-38	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL	27
Exendin-4	HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPS	39
GLP-1	HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFFIAWLVKGRG	31
Glucagón	HSQGTFTSDYSKYLD SRRAQDFVQWLMNT	29
Oxintomodulina	HSQGTFTSDYSKYLD SRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA	37
GIP	YAEGTFTSDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGGKNDWKHNITQ	42
GLP-2	HADGSFSDMNTIIDNLAARDFINWLIQTKITD	33
Secretina	HSDGTFTSELSRLREGARLQRLQLGLV	27

Fig. 1



- △— Vehículo
-*..... GLP-1 (AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)
- GLP-1 (AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/ Estrógeno(17-ester) 40 ug/kg-día
- ▽- GLP-1 (AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/ Estrógeno(17-ester) 400 ug/kg-día

Fig. 2a

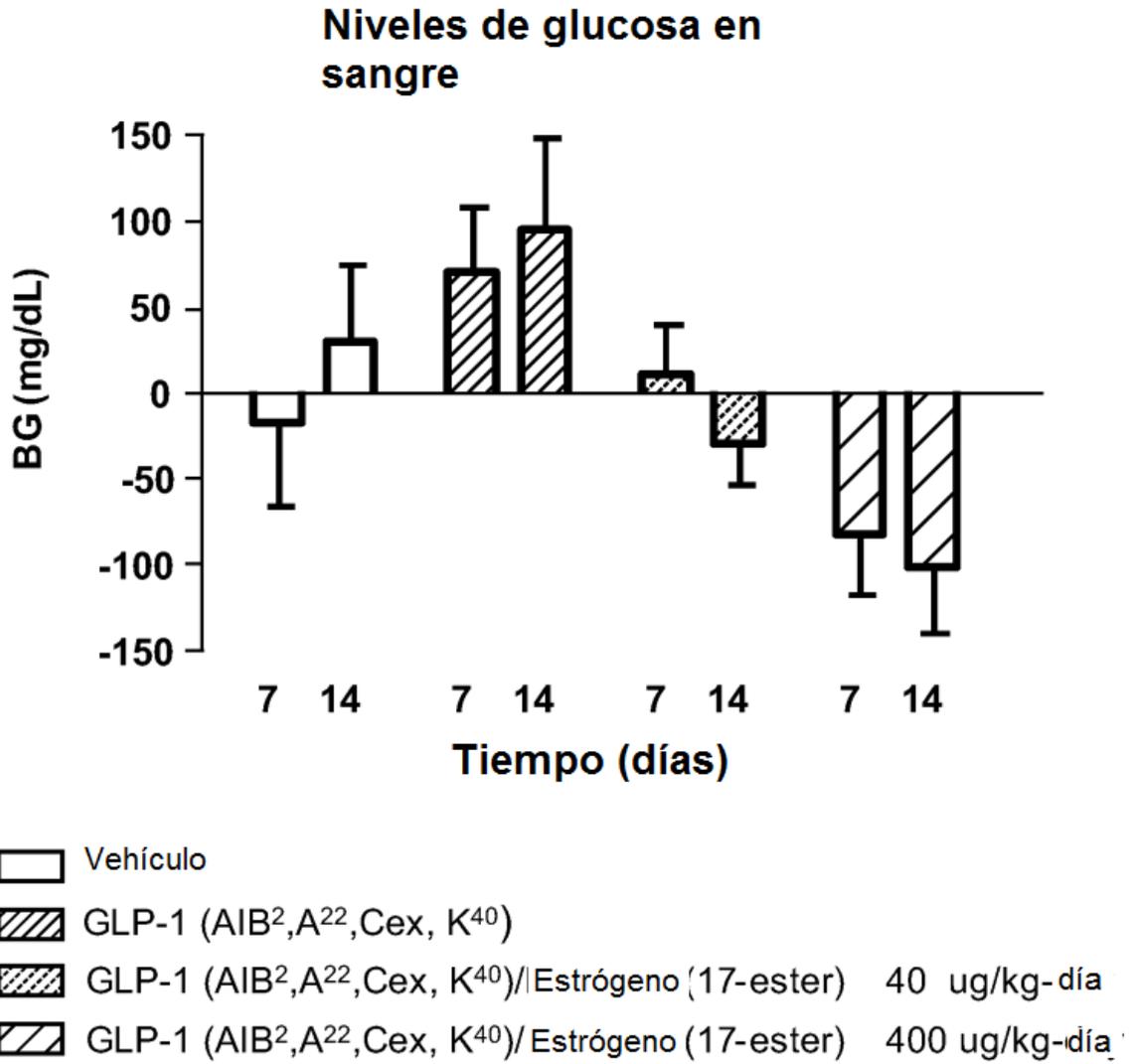
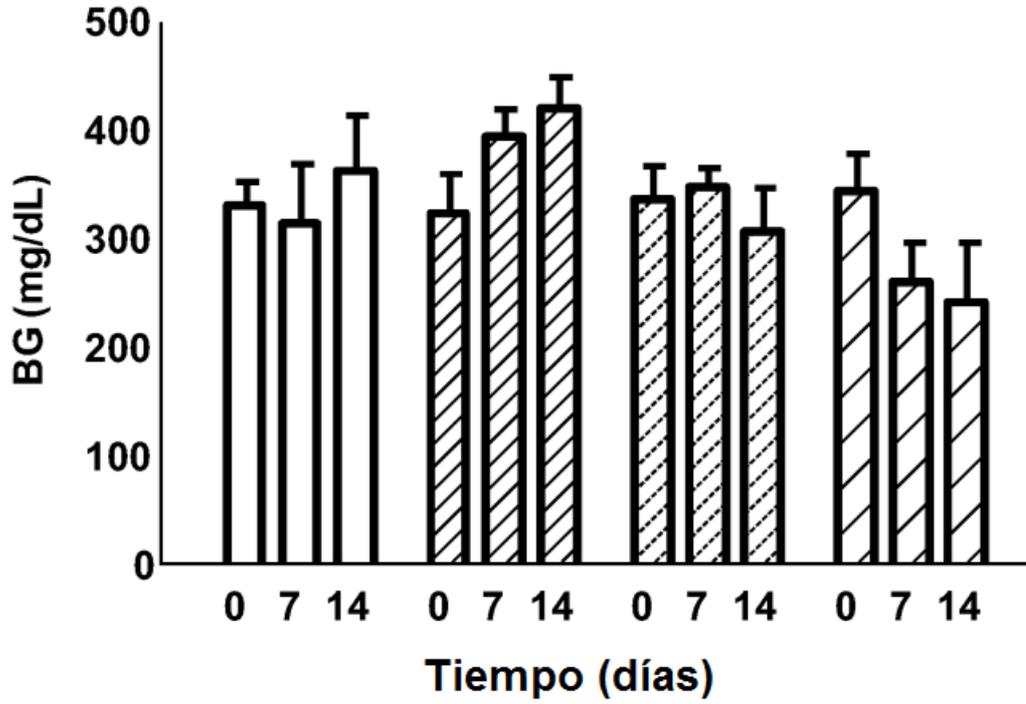


Fig. 2b

Niveles de glucosa en sangre



- Vehículo
- GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰)
- GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/Estrógeno (17-ester) 40 ug/kg-día
- GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/Estrógeno (17-ester) 400 ug/kg-día

Fig. 2c

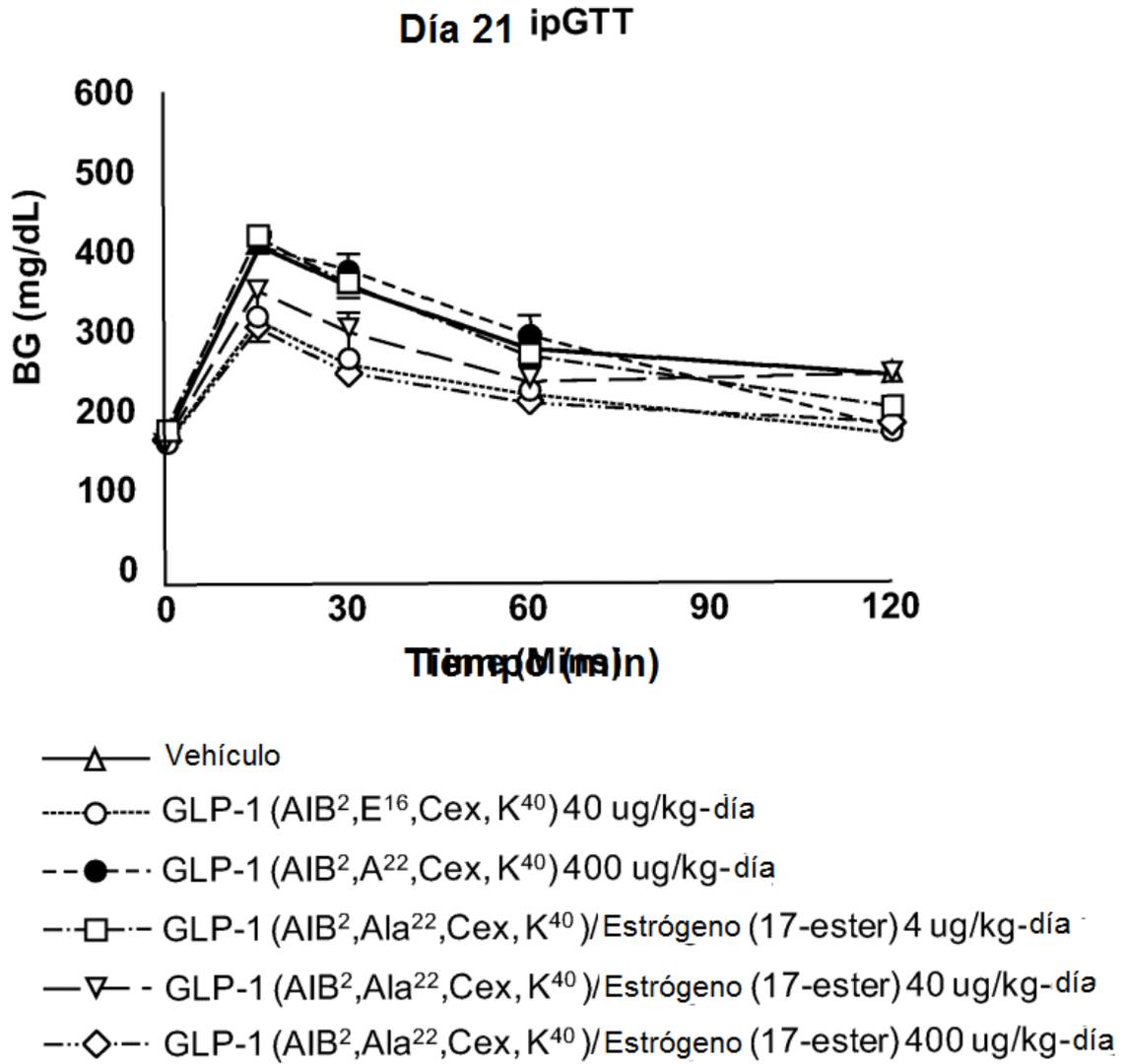


Fig. 3a

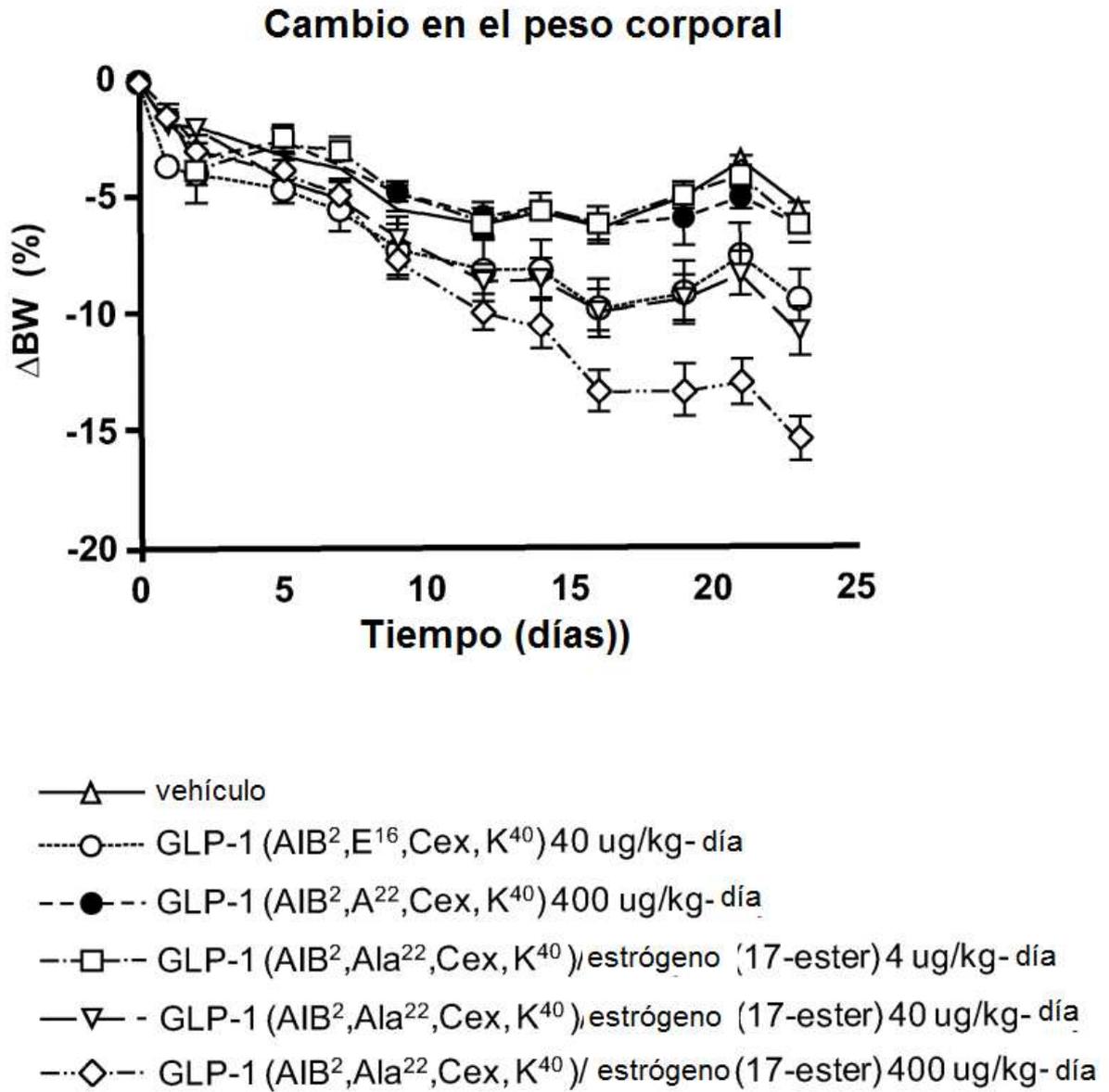


Fig. 3b

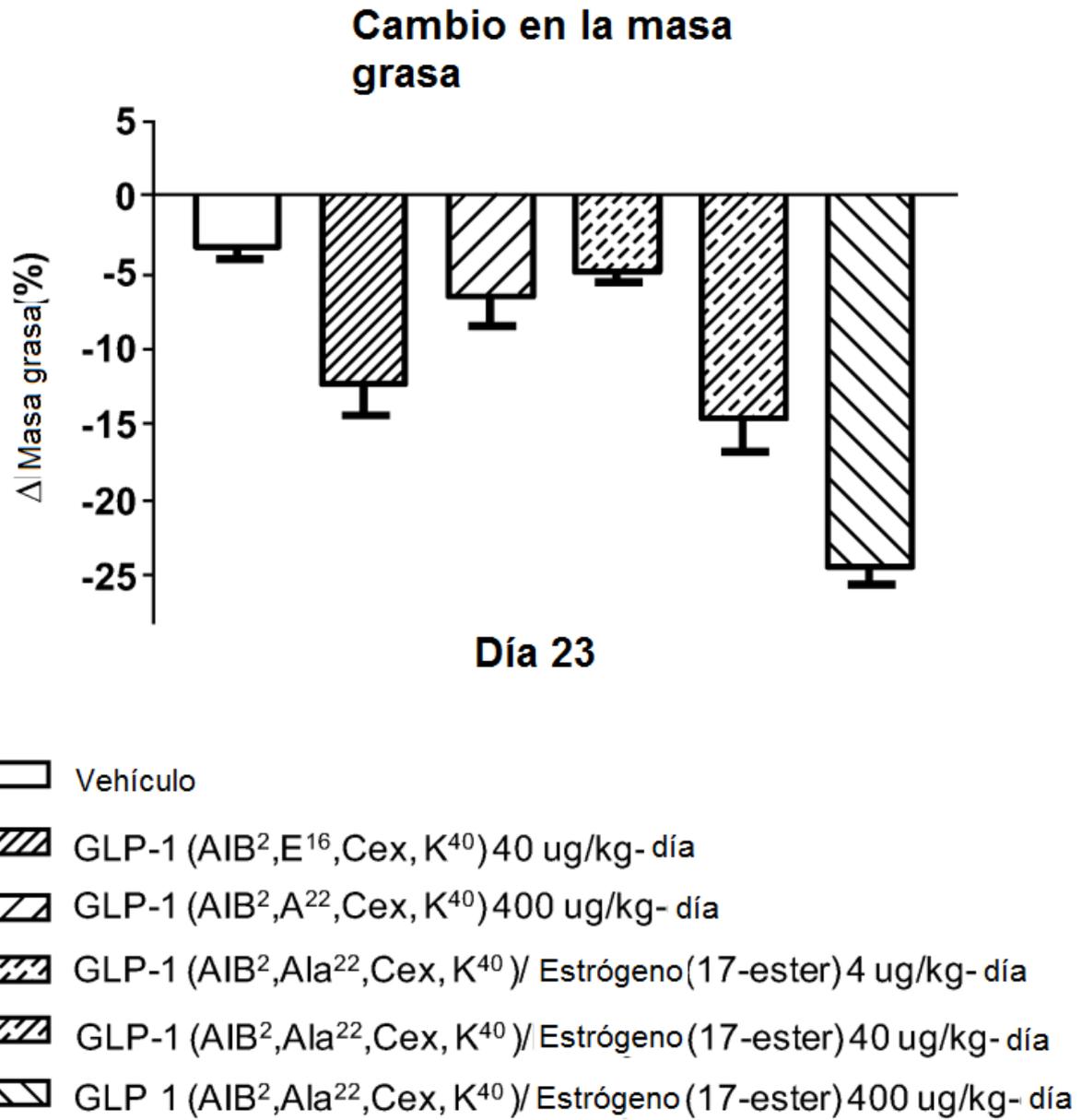


Fig. 3c

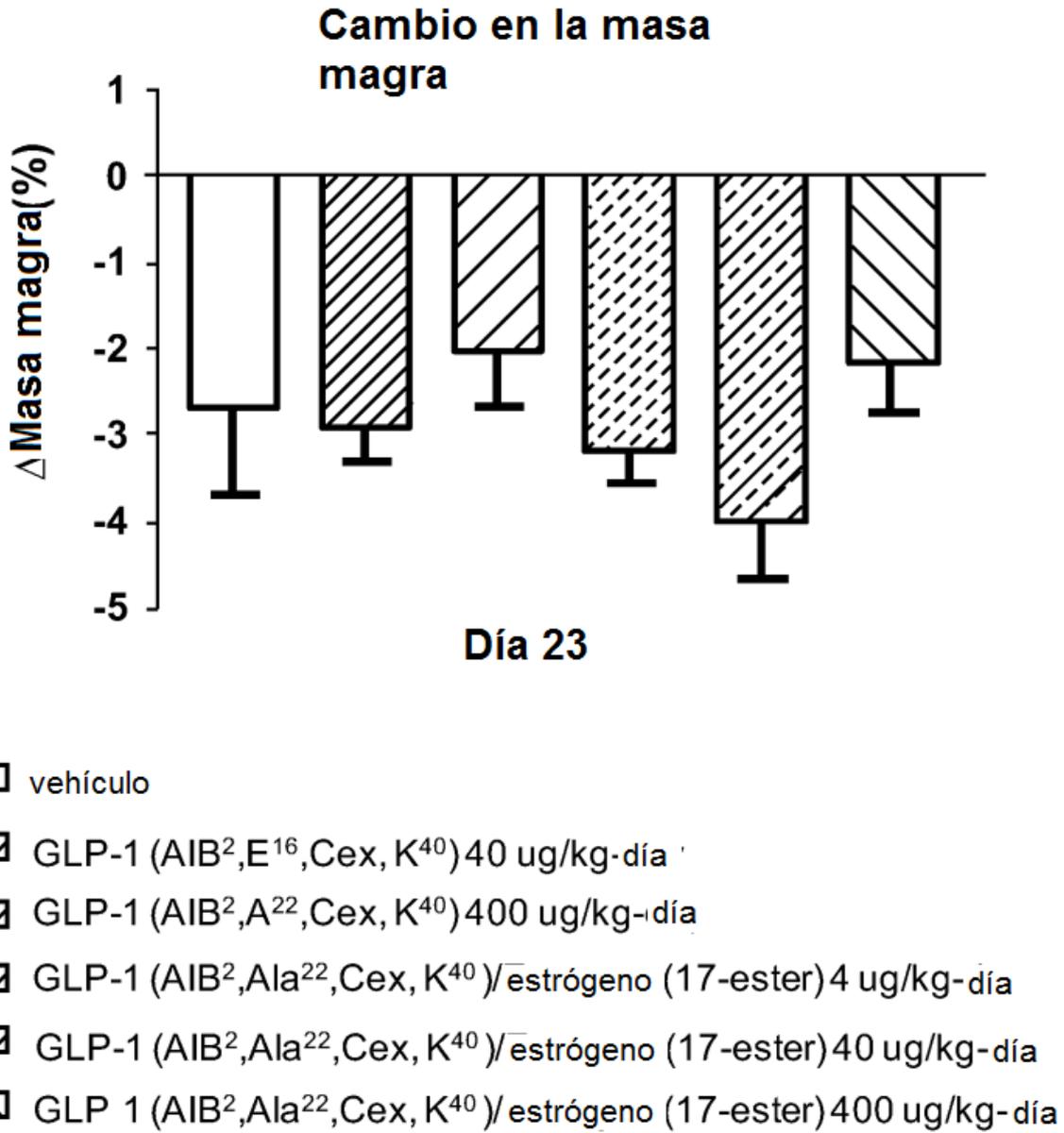


Fig. 3d

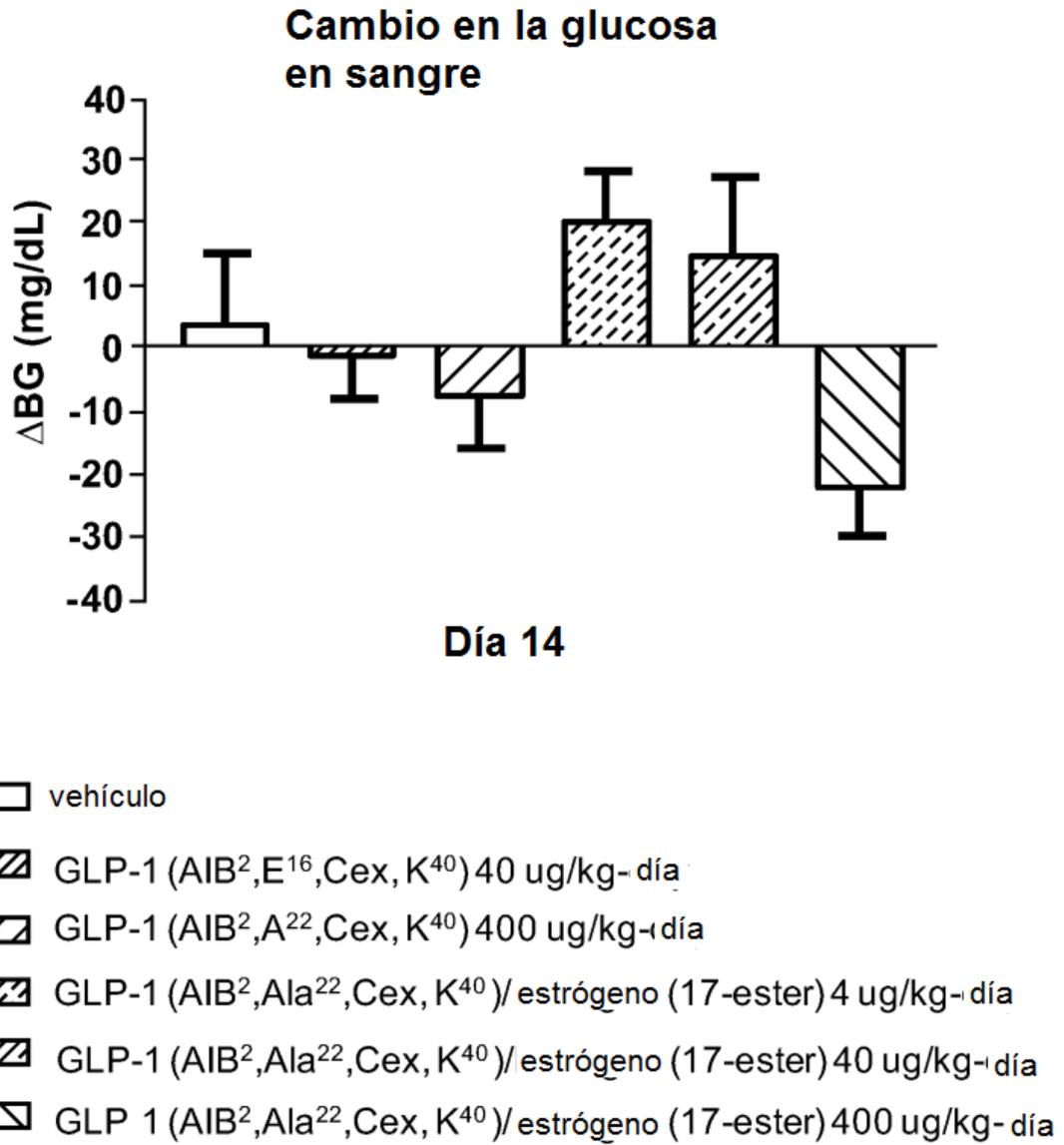
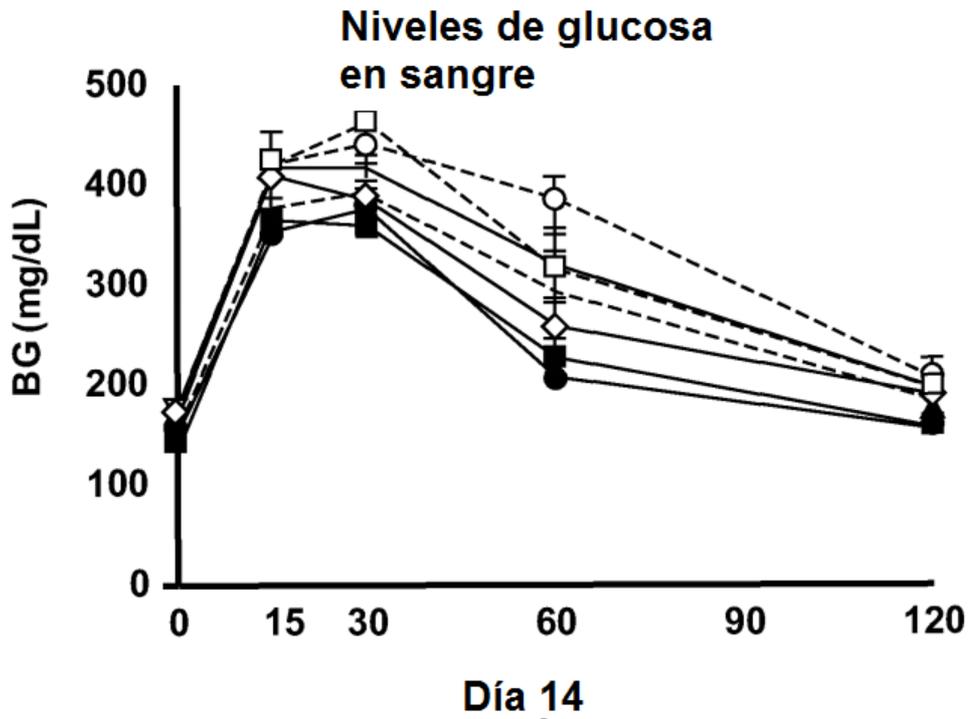
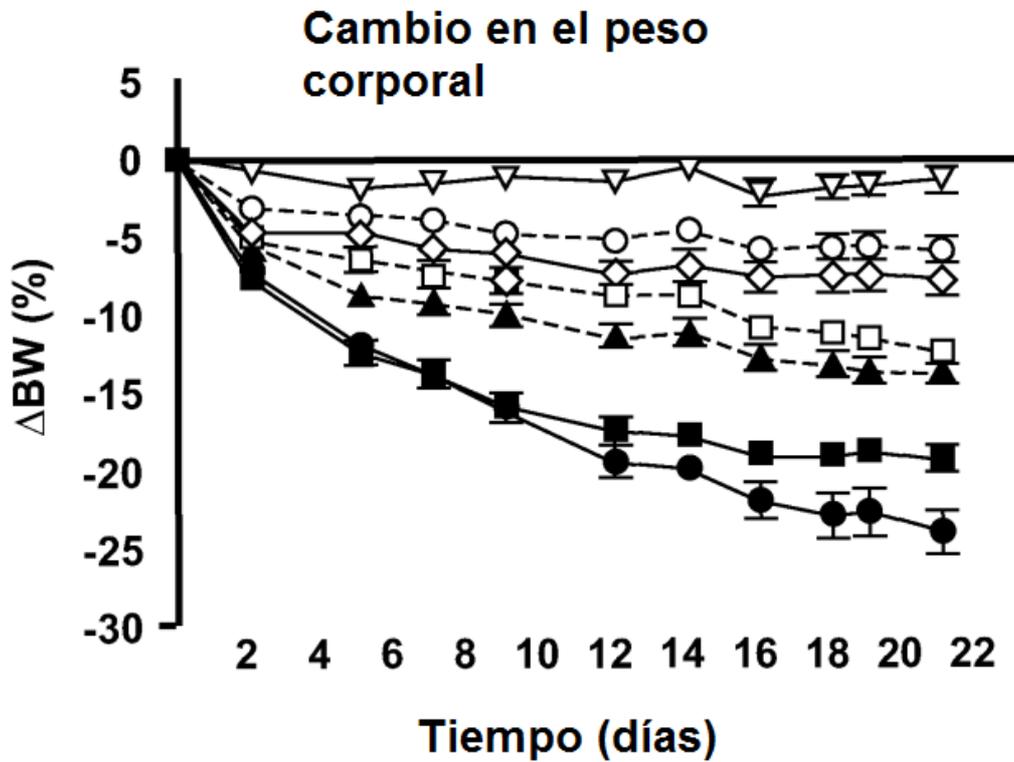


Fig. 3e



- ▽— vehículo
- GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 40ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 40 ug/kg- día
- ▲-- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 40 ug/kg- día
- ◇— GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 400 ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 400 ug/kg- día

Fig. 4a



- ▽— vehículo
- GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 40ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 40 ug/kg- día
- ▲--- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 40 ug/kg- día
- ◇— GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 400 ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 400 ug/kg- día

Fig. 4b

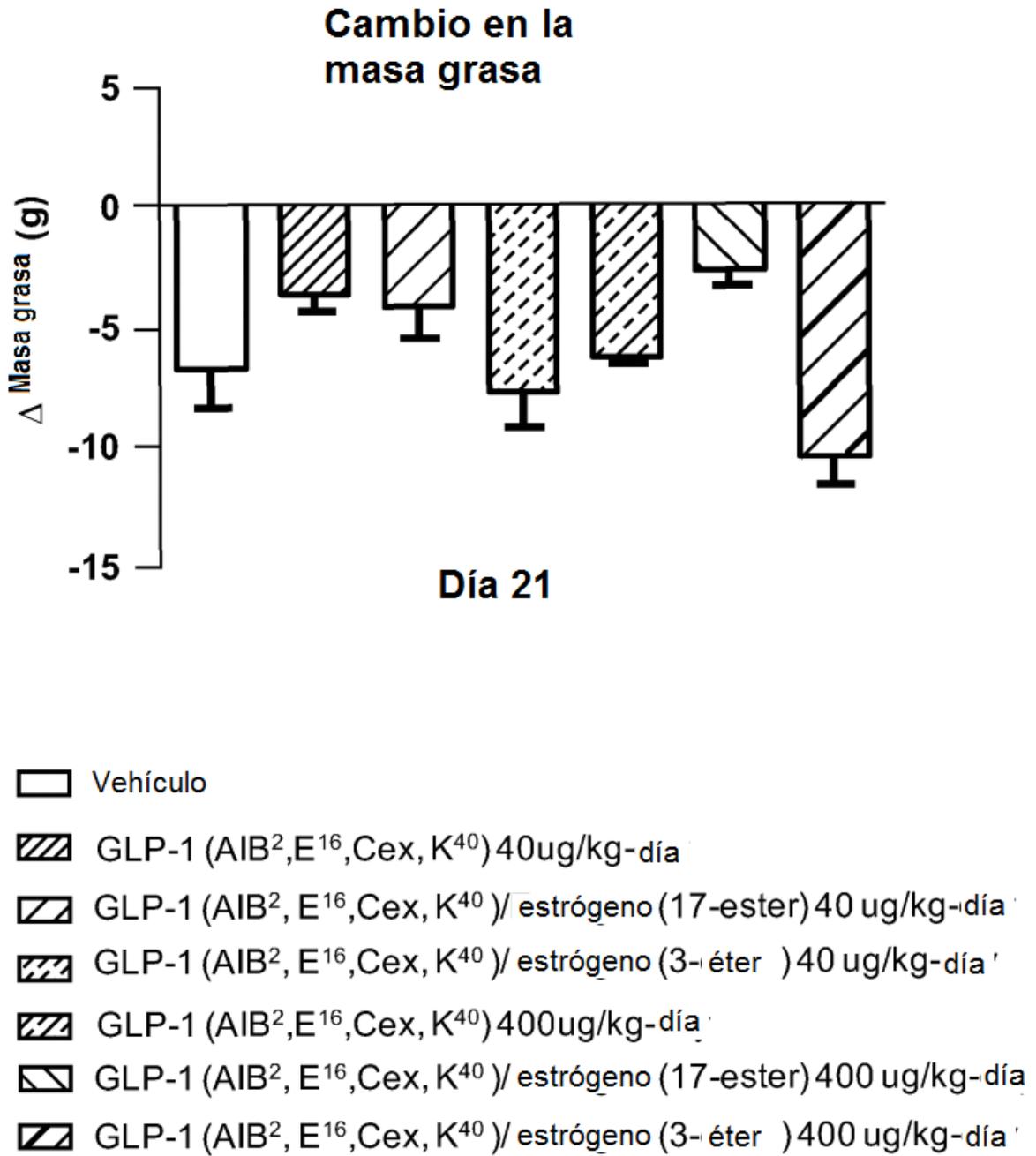


Fig. 4c

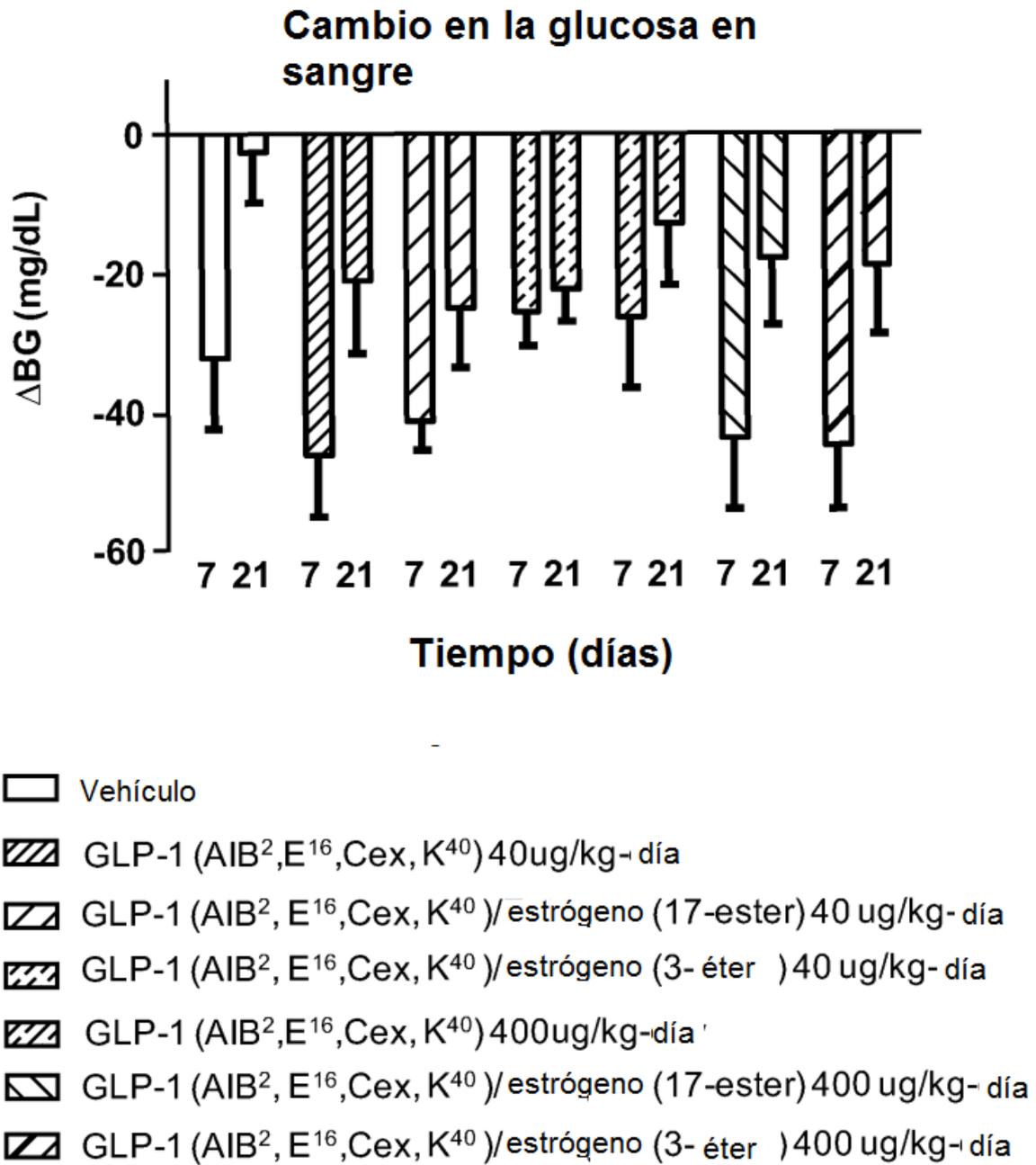


Fig. 4d

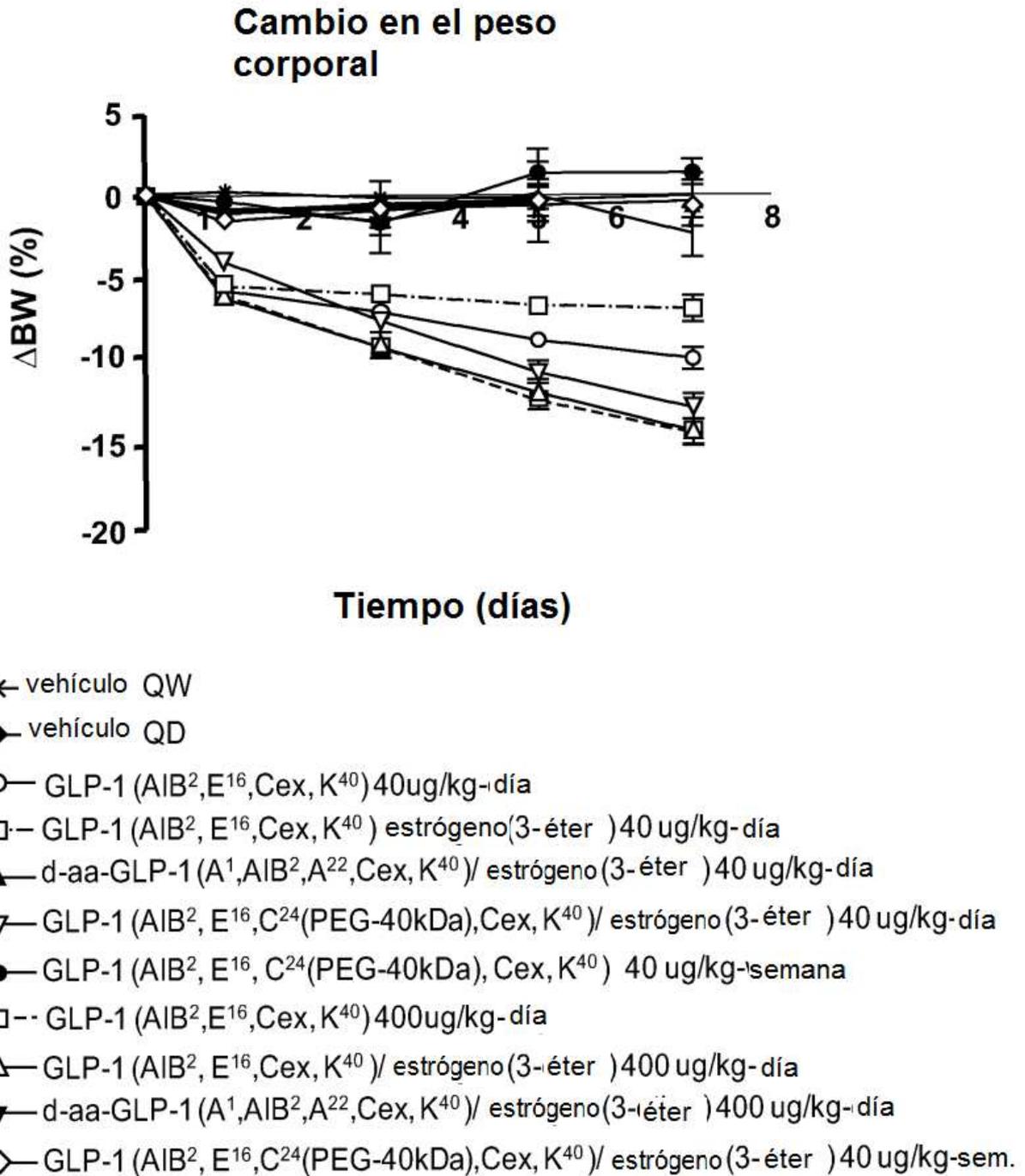
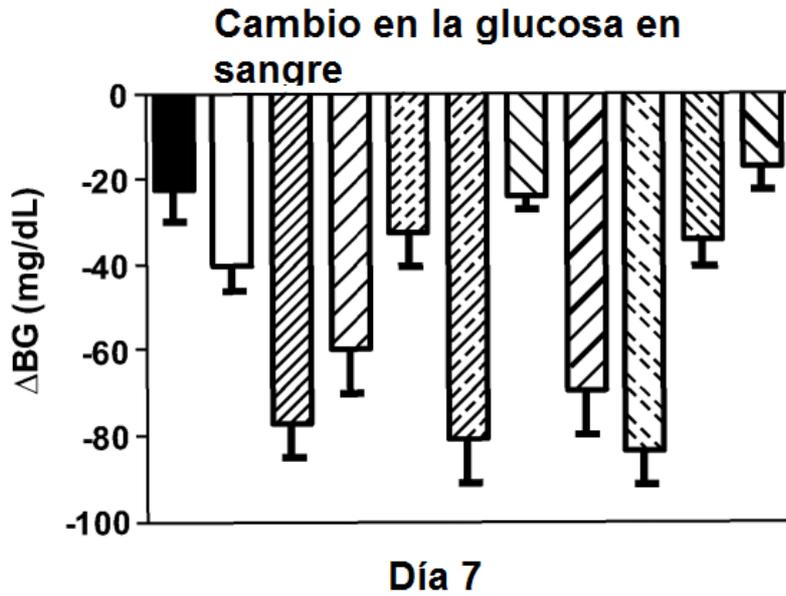
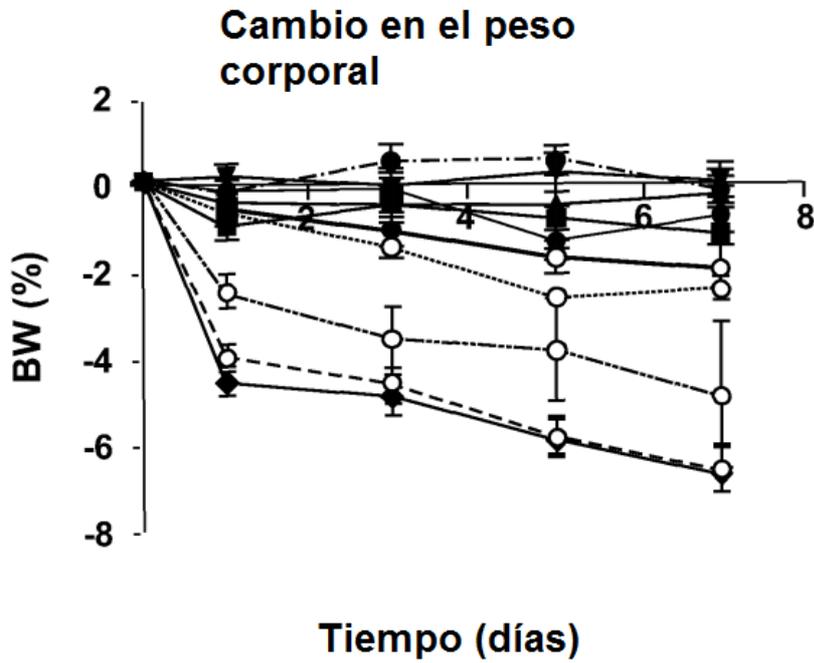


Fig. 5a



- Vehículo QW
- Vehículo QD
- ▨ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰)40ug/kg- día
- ▧ GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3- éter) 40 ug/kg- día
- ▩ d-aa-GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3- éter) 40 ug/kg- día
- ▦ GLP-1 (AIB², E¹⁶,C²⁴(PEG-40kDa),Cex, K⁴⁰)/estrógeno(3- éter) 40 ug/kg- día
- ▤ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) 40 ug/kg-semana
- ▥ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰)400ug/kg- día
- ▧ GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/Estrogen (3- éter) 400 ug/kg- día
- ▩ d-aa-GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno(3- éter) 400 ug/kg- día
- ▦ GLP-1 (AIB², E¹⁶,C²⁴(PEG-40kDa),Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3- éter) 40 ug/kg-sem.

Fig. 5b



- ▼ vehículo
- GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 40ug/kg- día
- d-aa-GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 40 ug/kg- día
- ▲— GLP-1 (AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 40ug/kg- día
- ◆— GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 40 ug/kg- día
- d-aa-GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ether) 40 ug/kg- día
- GLP-1 (AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 40ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 40 ug/kg- día
- d-aa-GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 40 ug/kg- día
-○..... GLP-1 (AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-ester) 40 ug/kg- día

Fig. 6a

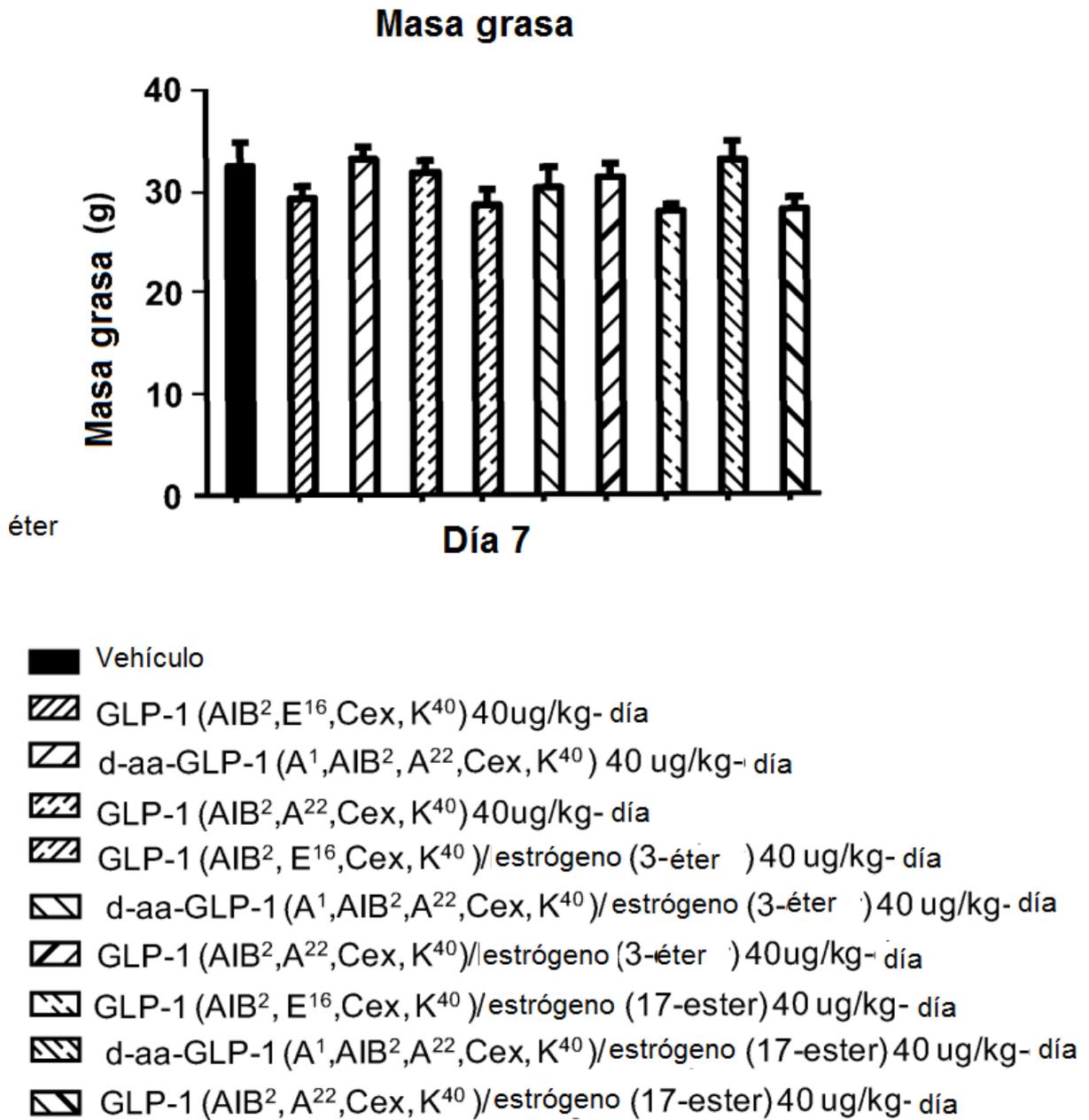


Fig. 6b

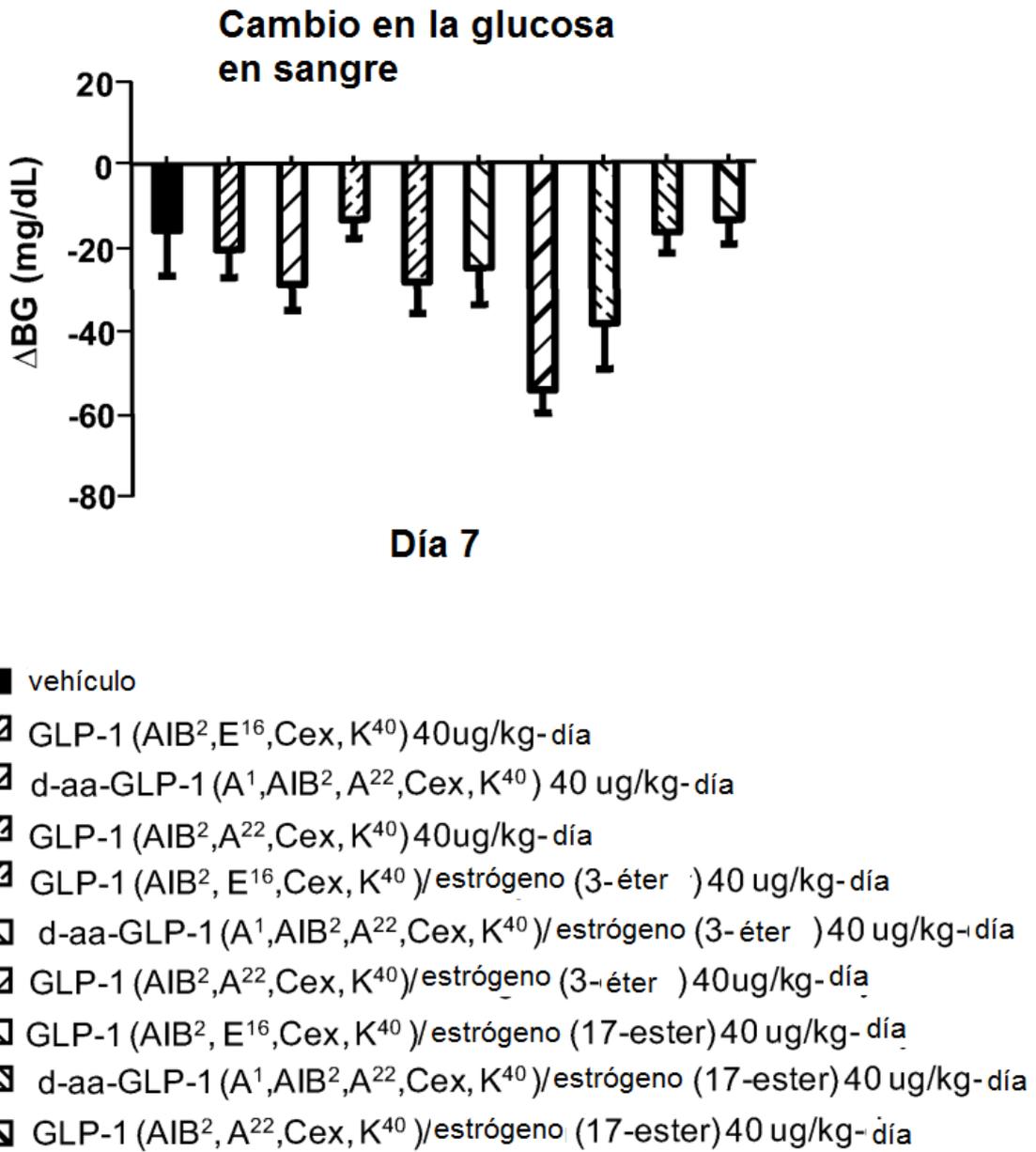
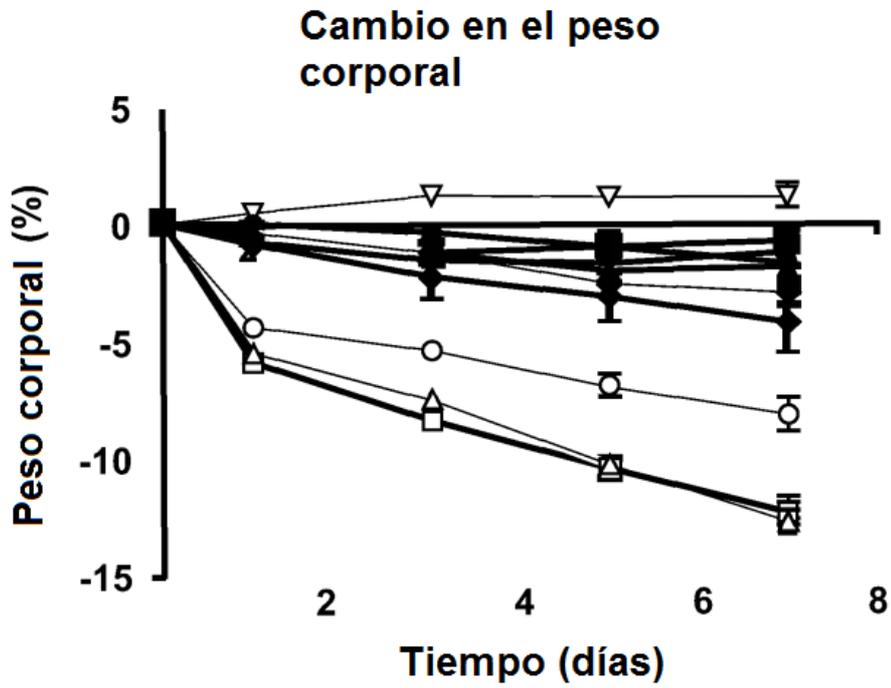
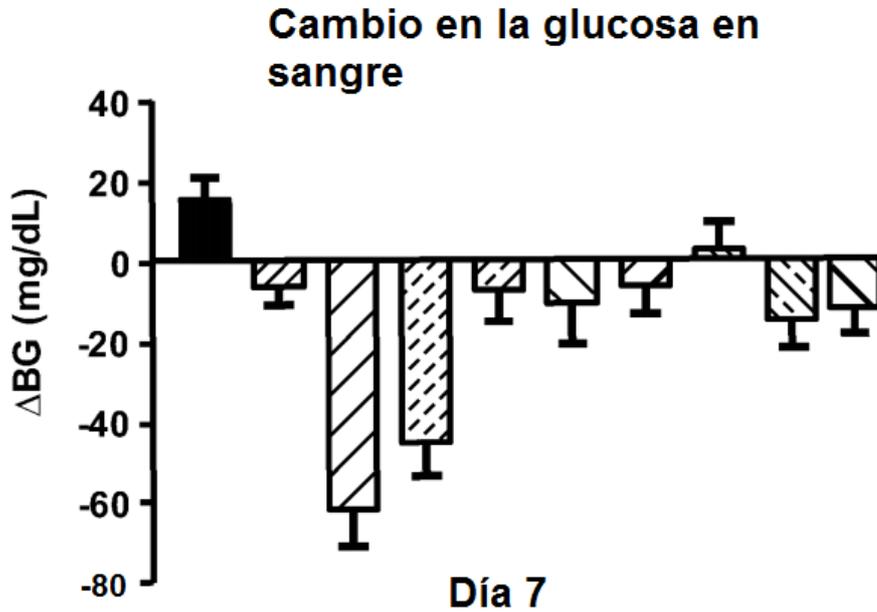


Fig. 6c



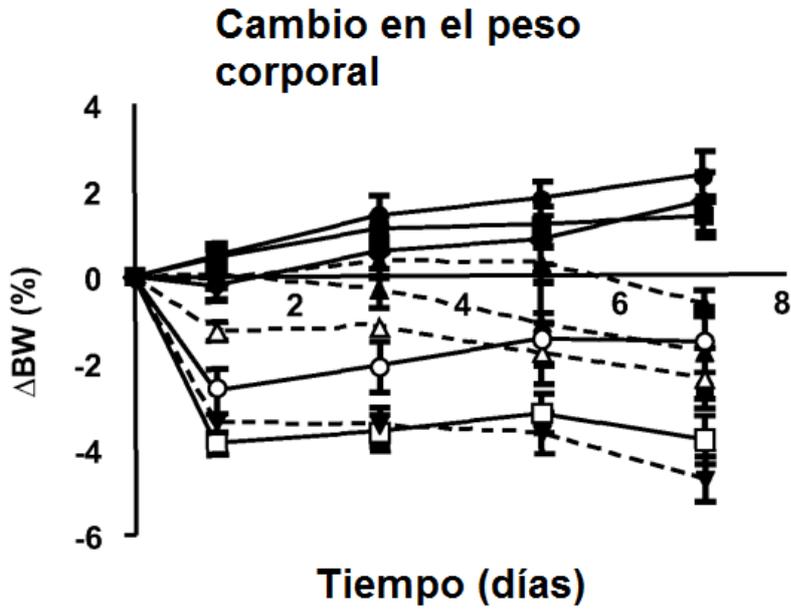
- vehículo
- GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) 400 ug/kg-día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 400 ug/kg-día
- △ GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) / estrógeno (17-éster) 400 ug/kg-día
- ▽ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 400 ug/kg-día
- ◆ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 400 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (17-éster) 400 ug/kg-día
- ▲ GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 400 ug/kg-día
- ▼ GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 400 ug/kg-día
- ◆ GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (17-éster) 400 ug/kg-día

Fig. 7a



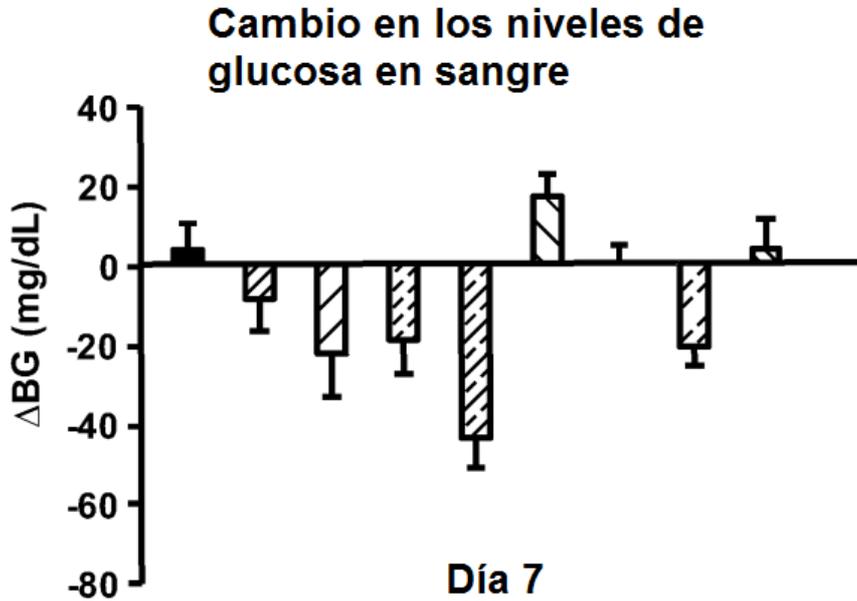
- vehículo
- ▨ GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) 400 ug/kg-
- ▧ GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 400 ug/kg-día
- ▩ GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-éster) 400 ug/kg-día
- ▦ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 400 ug/kg-día
- ▧ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 400 ug/kg-día
- ▩ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-éster) 400 ug/kg-día
- ▦ GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 400 ug/kg-día
- ▧ GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 400 ug/kg-día
- ▩ GLP-1 (AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno (17-éster) 400 ug/kg-día

Fig. 7b



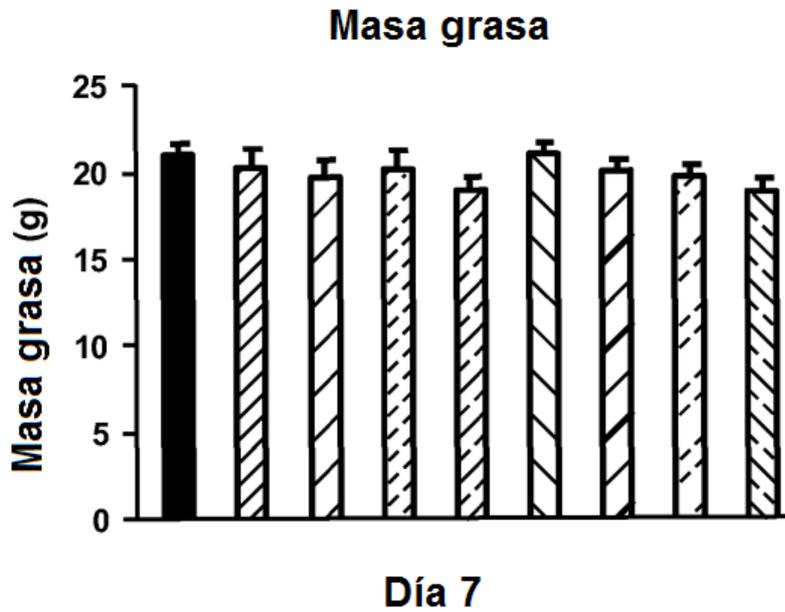
- ◆ vehículo
- GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex,K⁴⁰) 120ug/kg-día
- GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex,K⁴⁰) 400ug/kg-día
- △ GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 120 ug/kg-día
- ▽ GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 400 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 1,200ug/kg-día
- ▲ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 400 ug/kg-día
- ▲ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 1,200 ug/kg-día

Fig. 8a



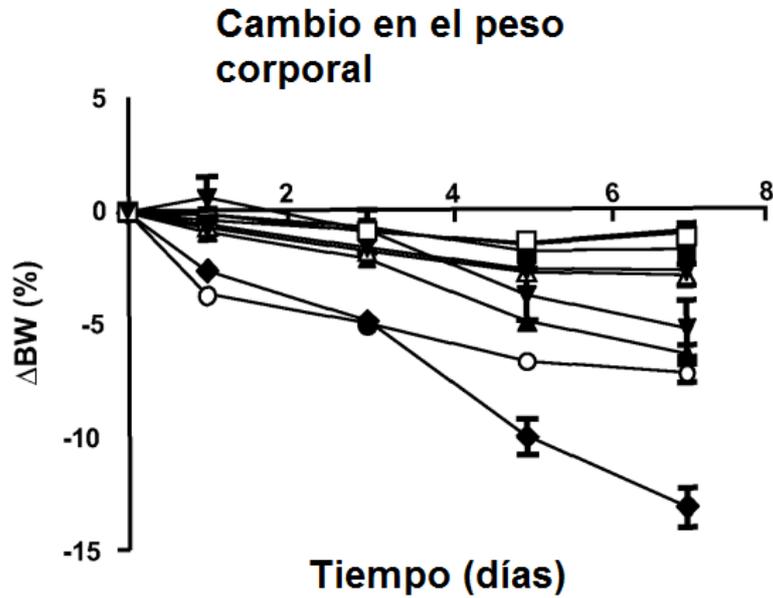
- vehículo
- ▨ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 120ug/kg-día
- ▧ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg-día
- ▩ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 120 ug/kg-día
- GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 400 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg-día
- ▬ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 1,200ug/kg-día
- ▮ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 400 ug/kg-día
- ▯ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 1,200 ug/kg-día

Fig. 8b



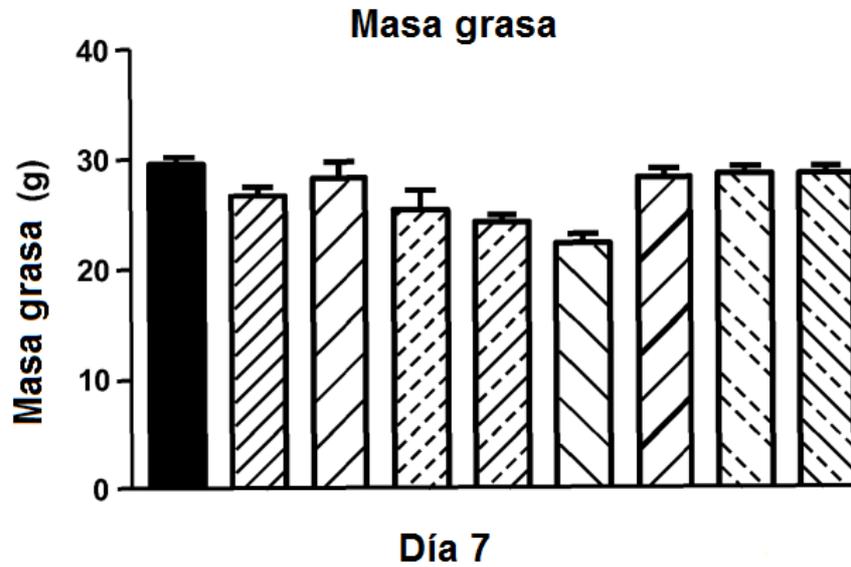
- Vehículo
- ▨ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 120ug/kg-día
- ▧ GLP-1 (AIB²,E¹⁶,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg-día
- ▩ GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 120 ug/kg-día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 400 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 400ug/kg-día
- ▬ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰) 1,200ug/kg-día
- ▮ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 400 ug/kg-día
- ▯ d-aa GLP-1 (A¹,AIB²,A²²,Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-ester) 1,200 ug/kg-día

Fig. 8c



- vehículo
- GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 40 ug/kg- día
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 4000 ug/kg- día
- ▲ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 400 ug/kg- día
- ▼ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 1200 ug/kg- día
- ◆ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 4000 ug/kg- día
- △ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) 40 ug/kg- día
- GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 40 ug/kg- día
- ▽ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) / colesterol (3-éter) 40 ug/kg- día

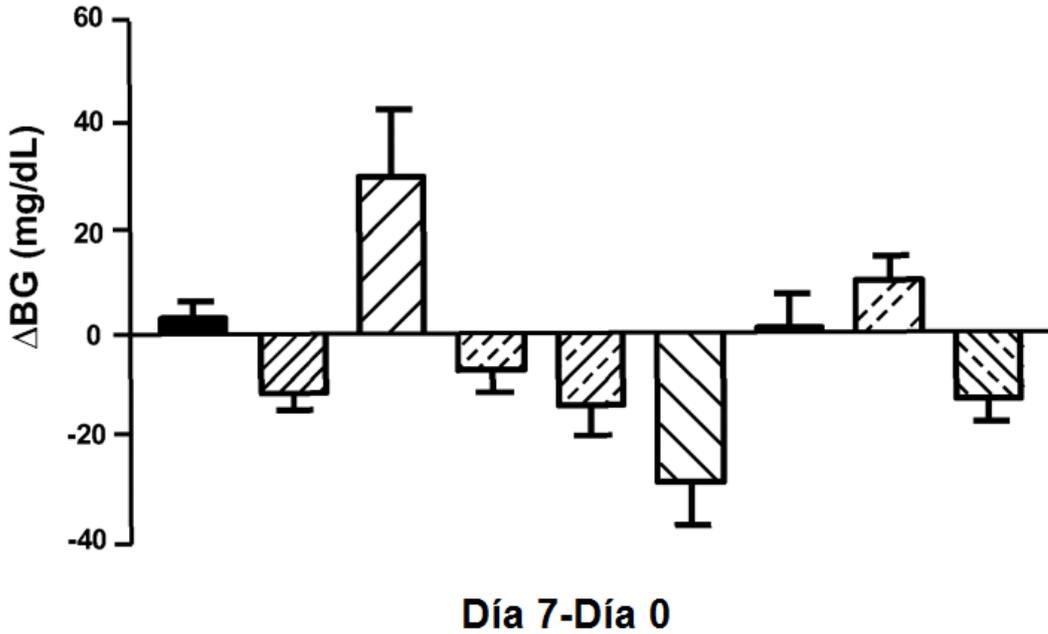
Fig. 9a



- vehículo
- ▨ GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 40 ug/kg-día
- ▧ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 4000 ug/kg-día
- ▩ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 400 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 1200 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 4000 ug/kg-día
- ▬ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) 40 ug/kg-día
- ▮ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 40 ug/kg-día
- ▯ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) / colesterol (3-éter) 40 ug/kg-día

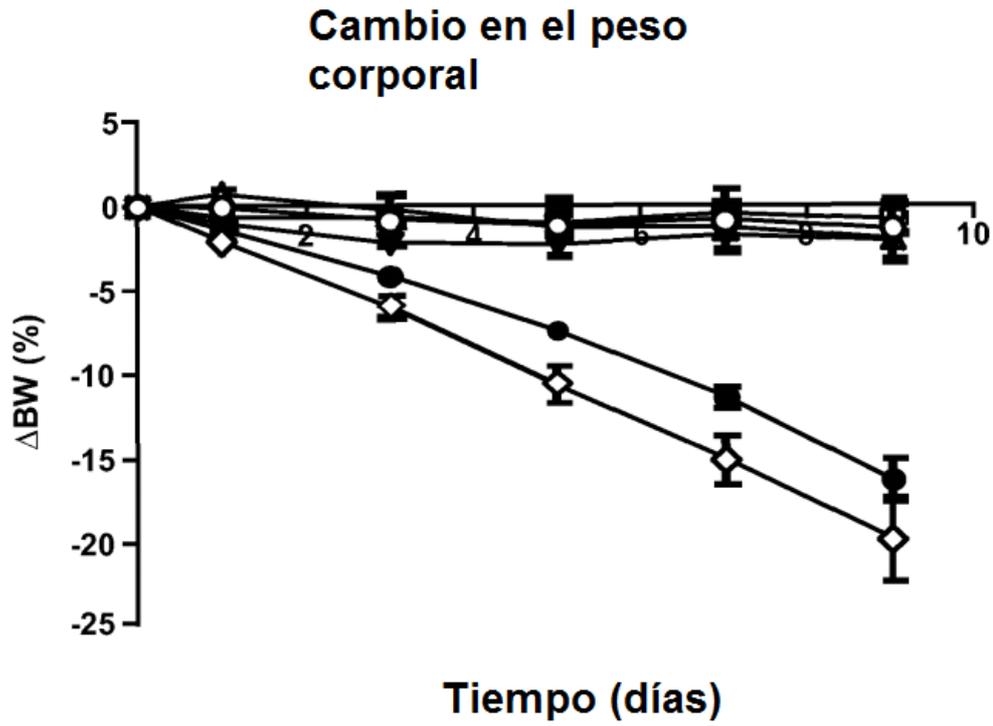
Fig. 9b

Cambio en los niveles de glucosa en sangre



- vehículo
- ▨ GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰)/estrógeno (3-éter) 40 ug/kg-día
- ▩ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) 4000 ug/kg-día
- ▧ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno(3-éster) 400 ug/kg-día
- ▦ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno(3-éster) 1200 ug/kg-día
- ▥ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰)/estrógeno(3-éster) 4000 ug/kg-día
- ▤ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰) 40 ug/kg-día
- ▣ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰)/estrógeno(3-éter) 40 ug/kg-día
- ▢ GLP-1 (AIB², E¹⁶, C²⁴(PEG-40kDa), Cex, K⁴⁰)/colesterol (3-éter) 40 ug/kg-día

Fig. 9c



- ▲ vehículo
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 1,200 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 1,200 ug/kg-día
- ▼ d-aa GLP-1 (AIB², E¹⁶, Cex, K⁴⁰) 4,000 ug/kg-día
- ◇ d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éster) 4,000 ug/kg-día
- d-aa GLP-1 (A¹, AIB², A²², Cex, K⁴⁰) / estrógeno (3-éter) 4,000 ug/kg-día

Fig. 10a

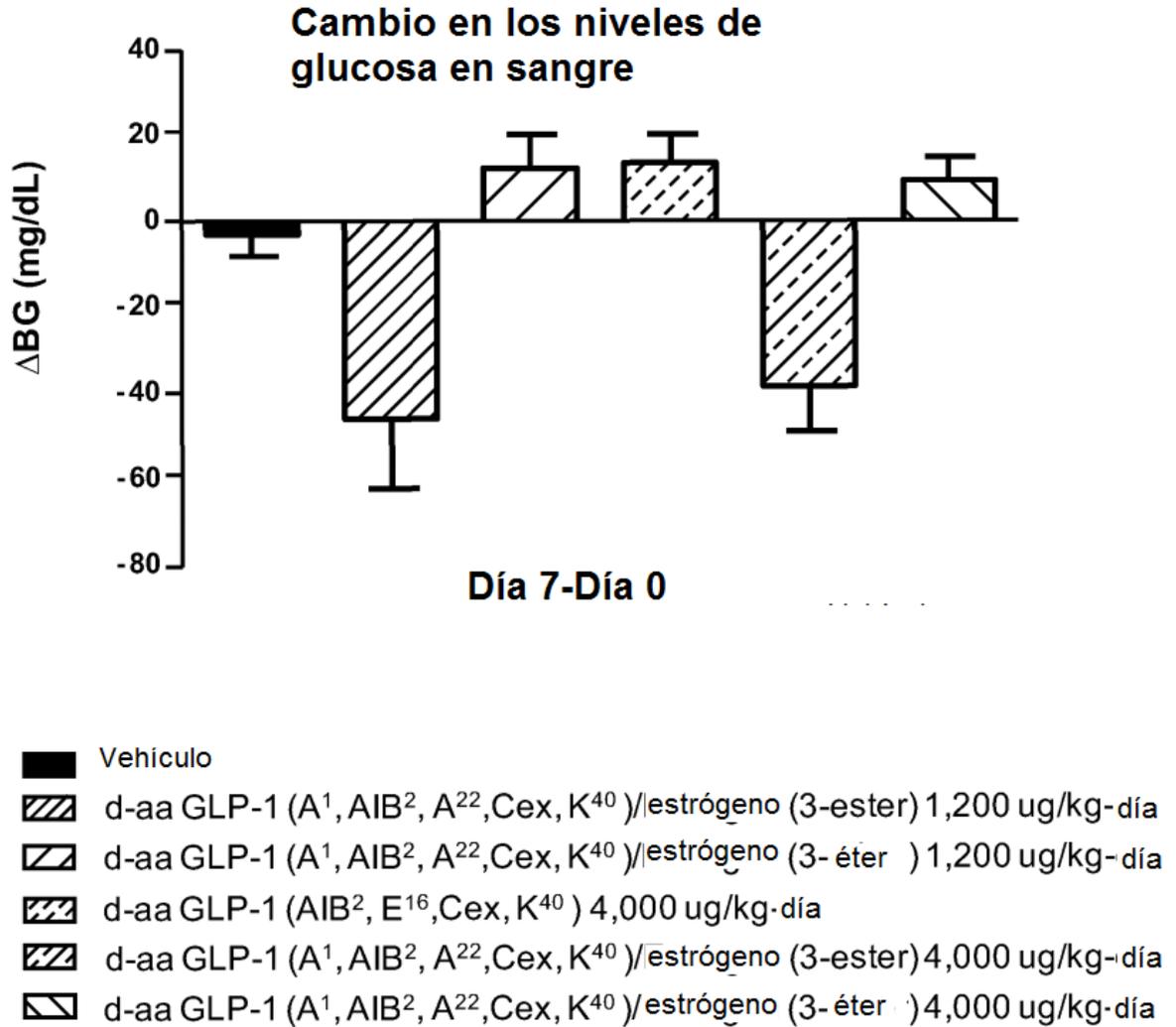
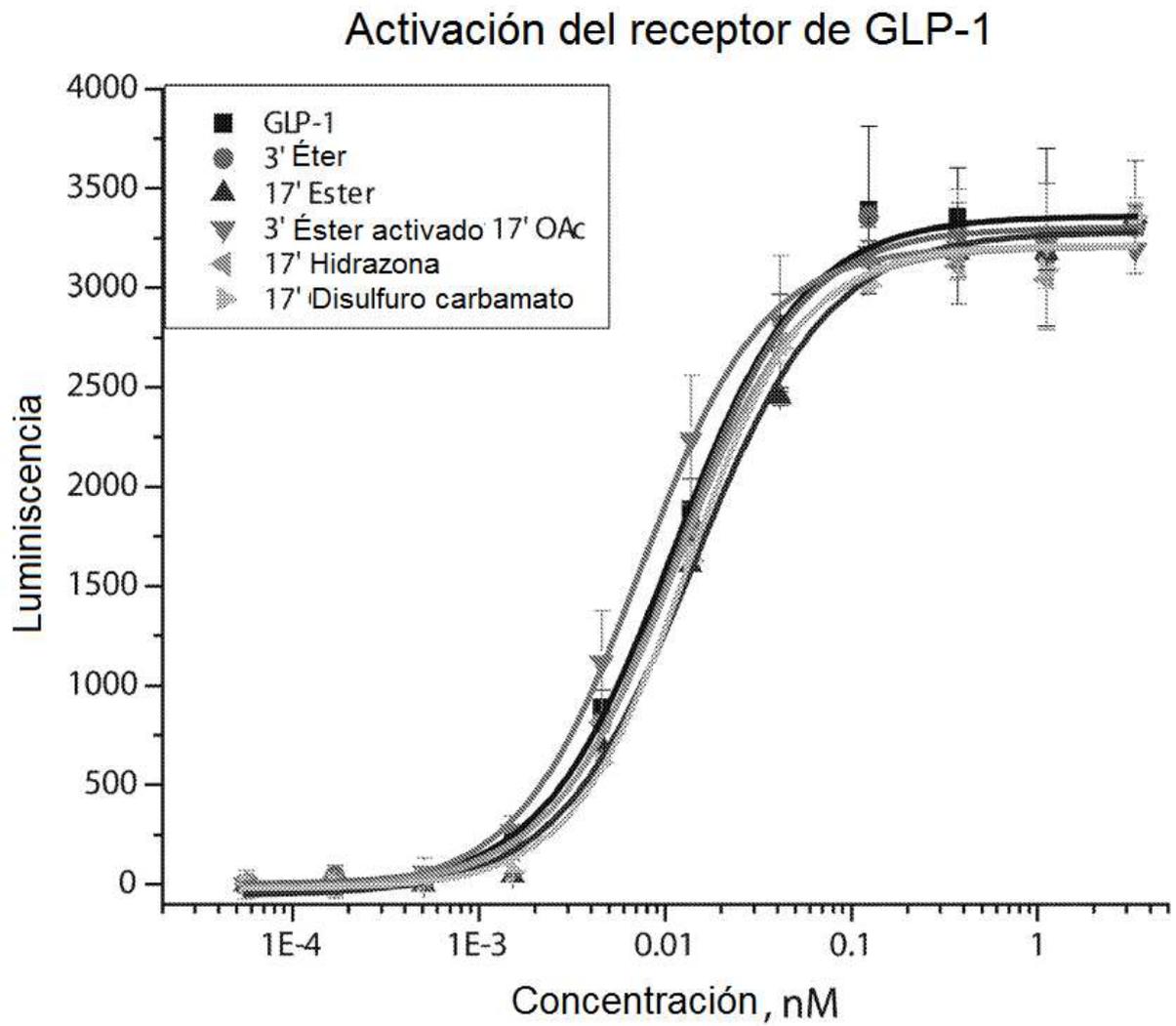


Fig. 10b

**Fig. 11a**

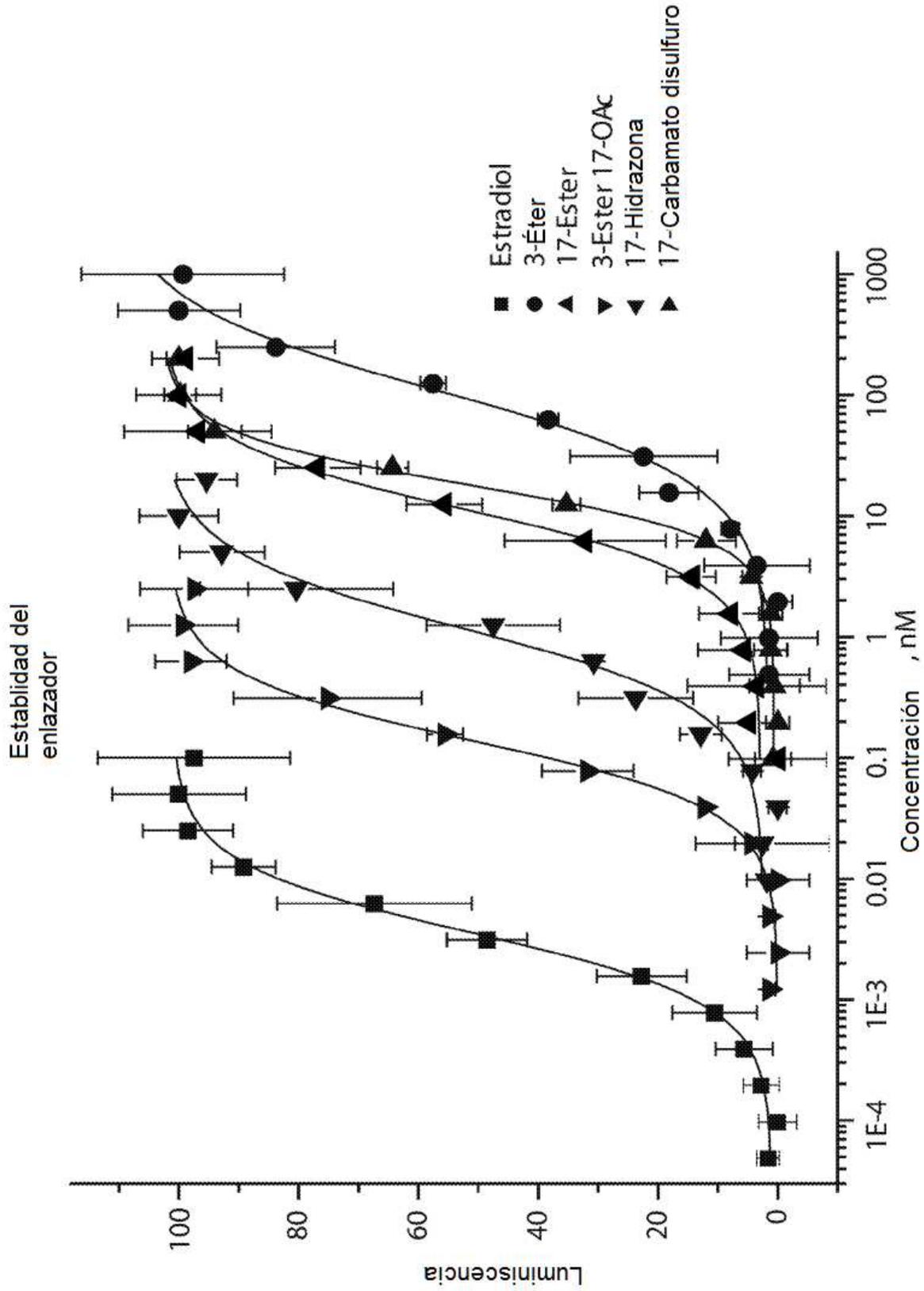


Fig. 11b

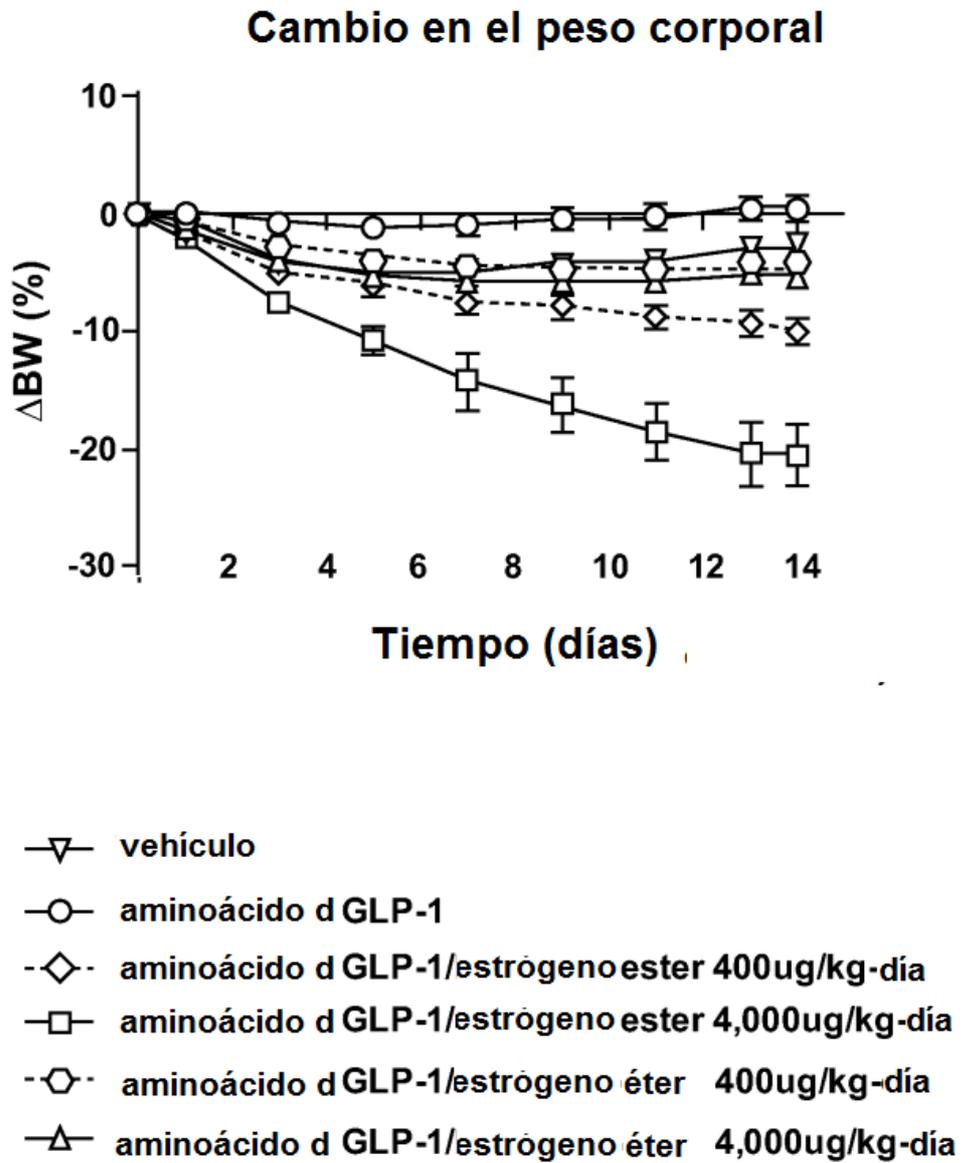


Fig. 12a

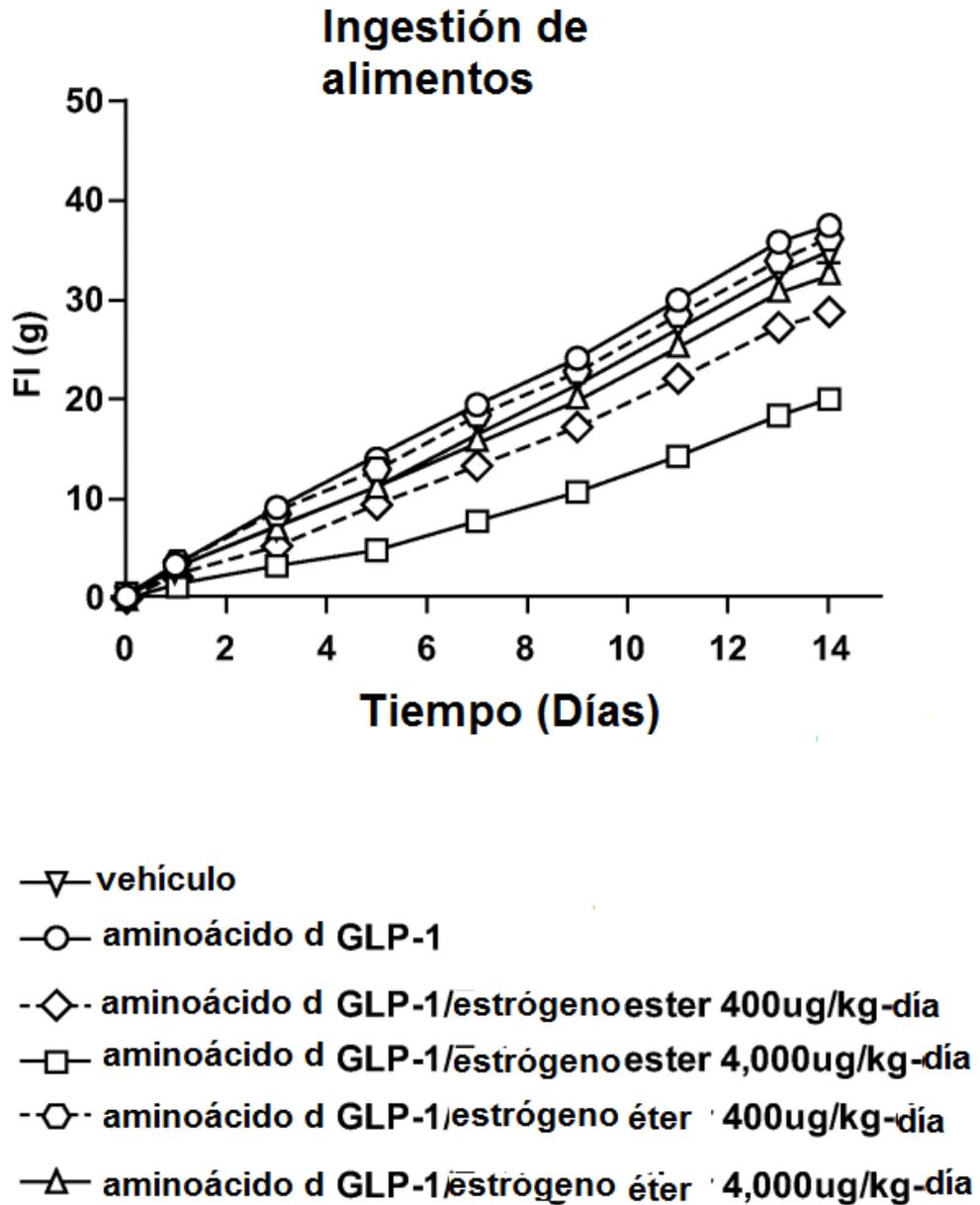


Fig. 12b

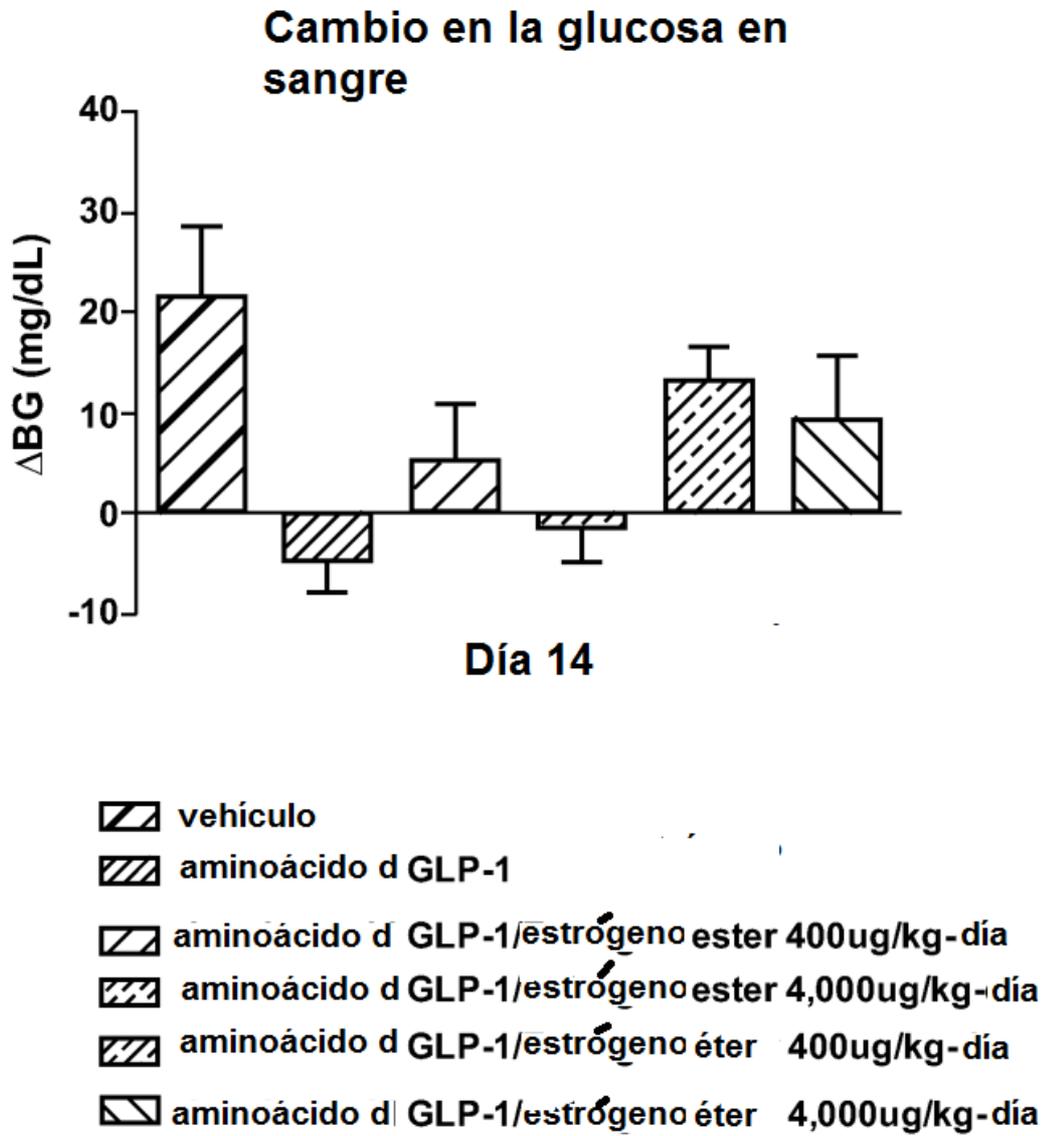


Fig. 12c

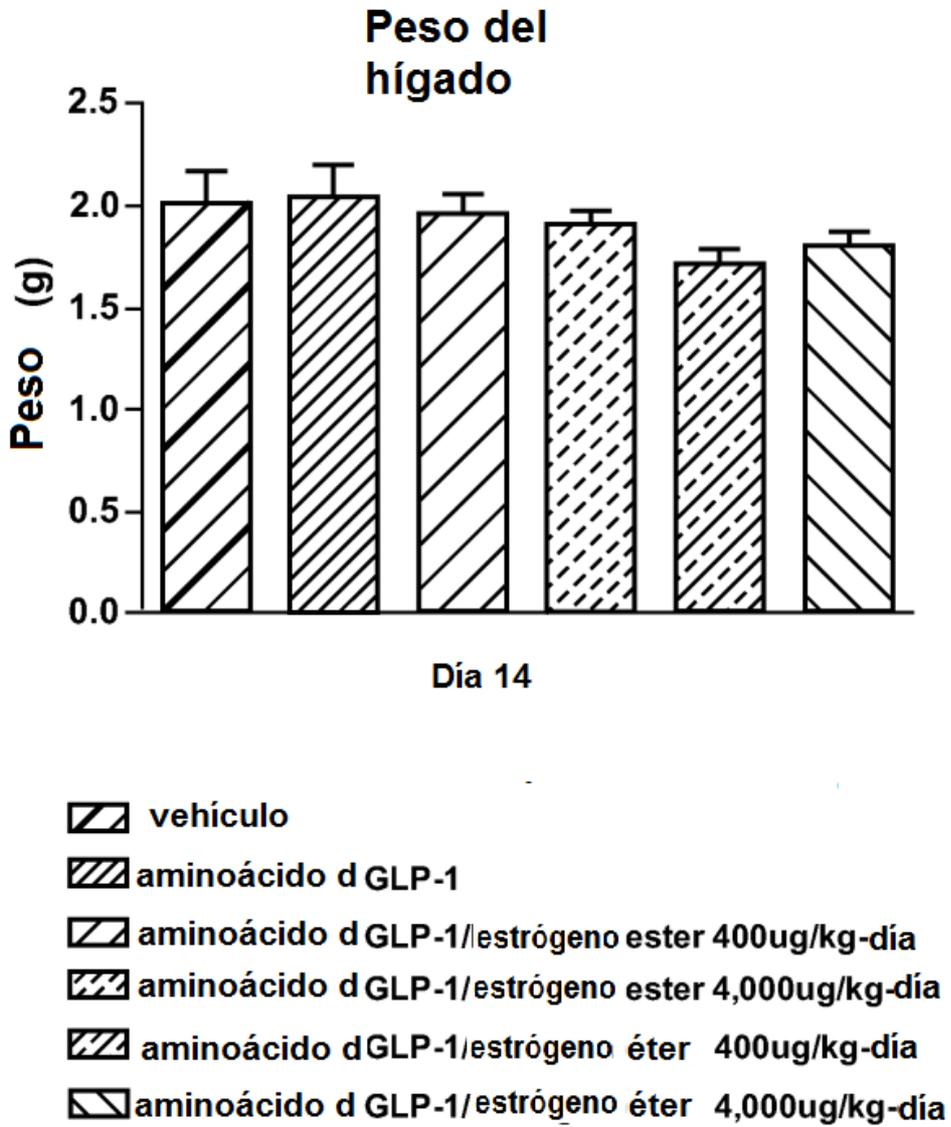


Fig. 12d

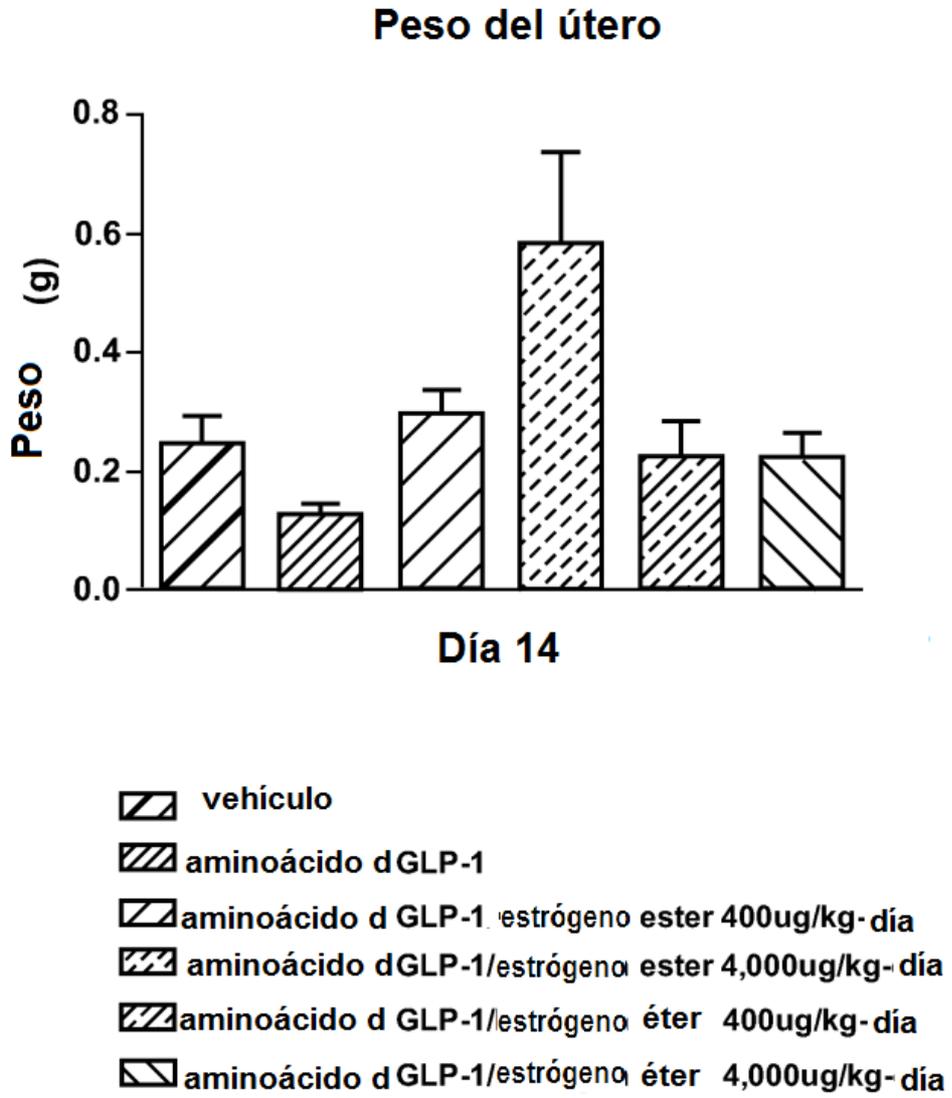


Fig. 12e

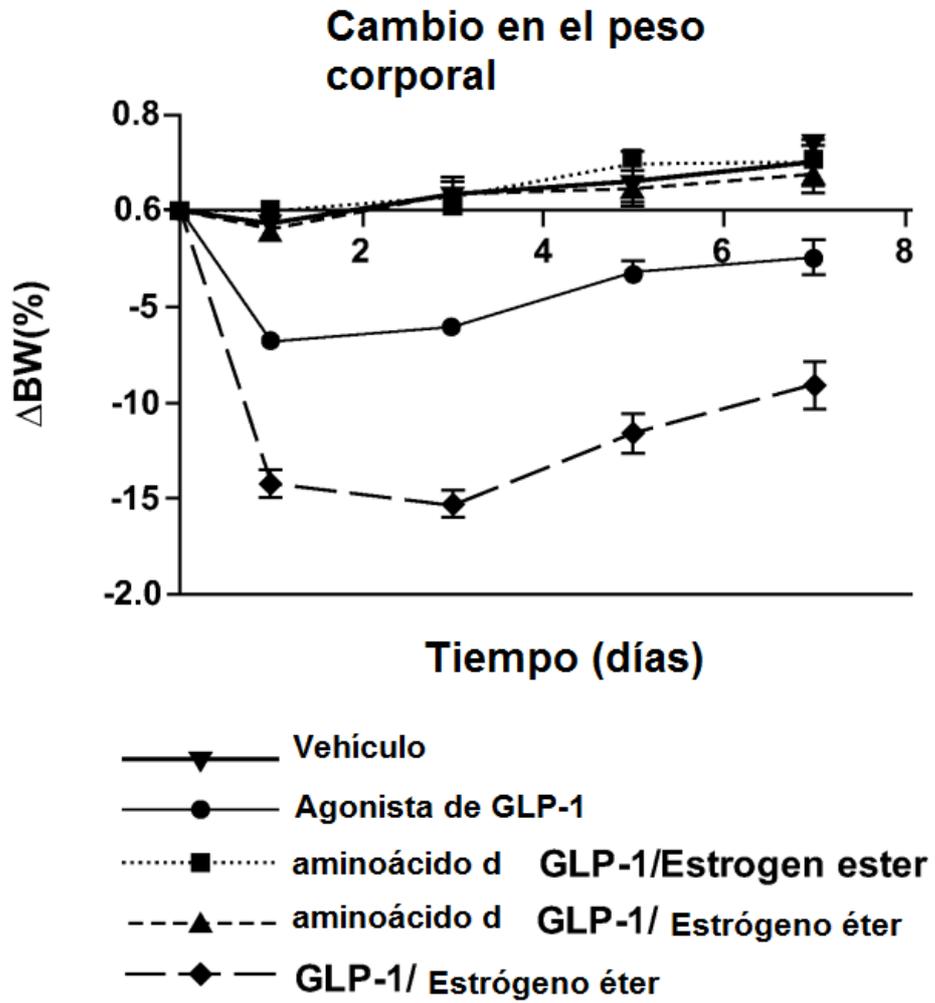


Fig. 13a

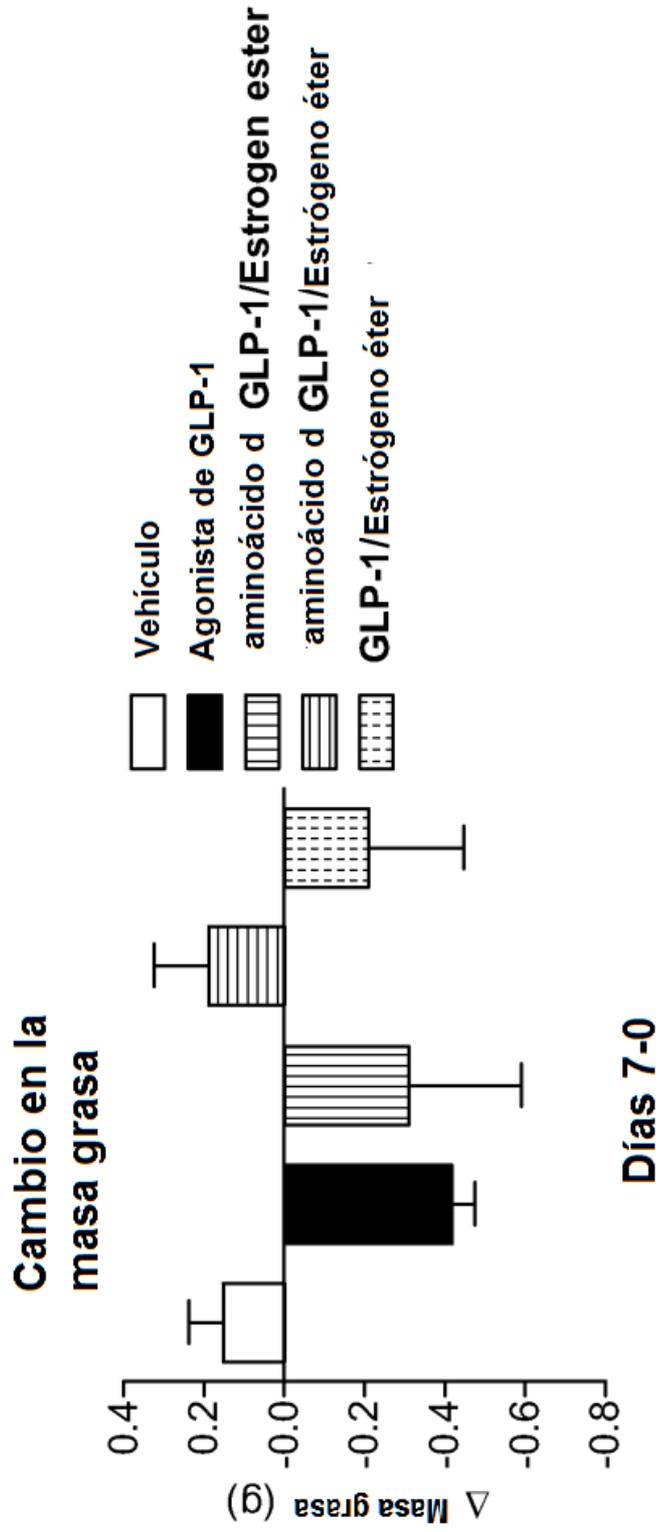


Fig. 13B

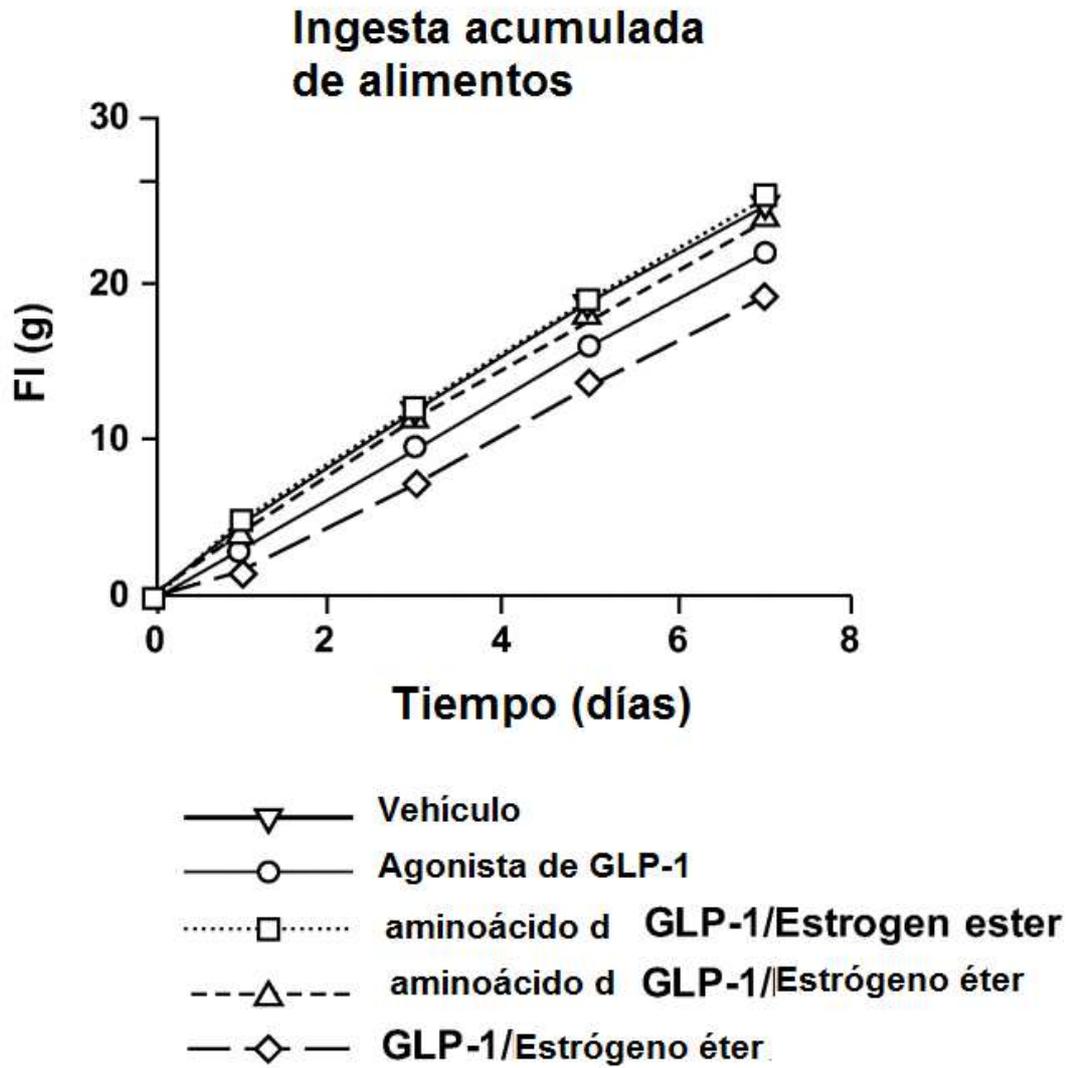


FIG. 13C

Cambio en los niveles de glucosa en sangre

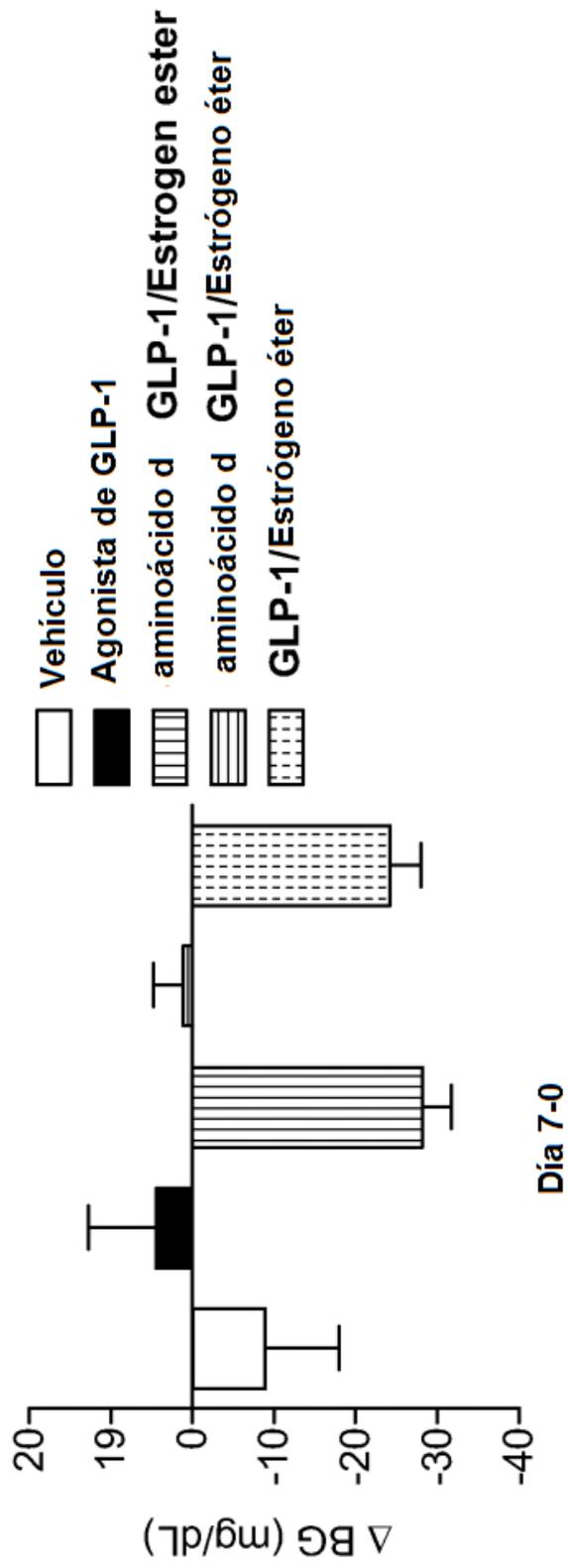


Fig. 13D

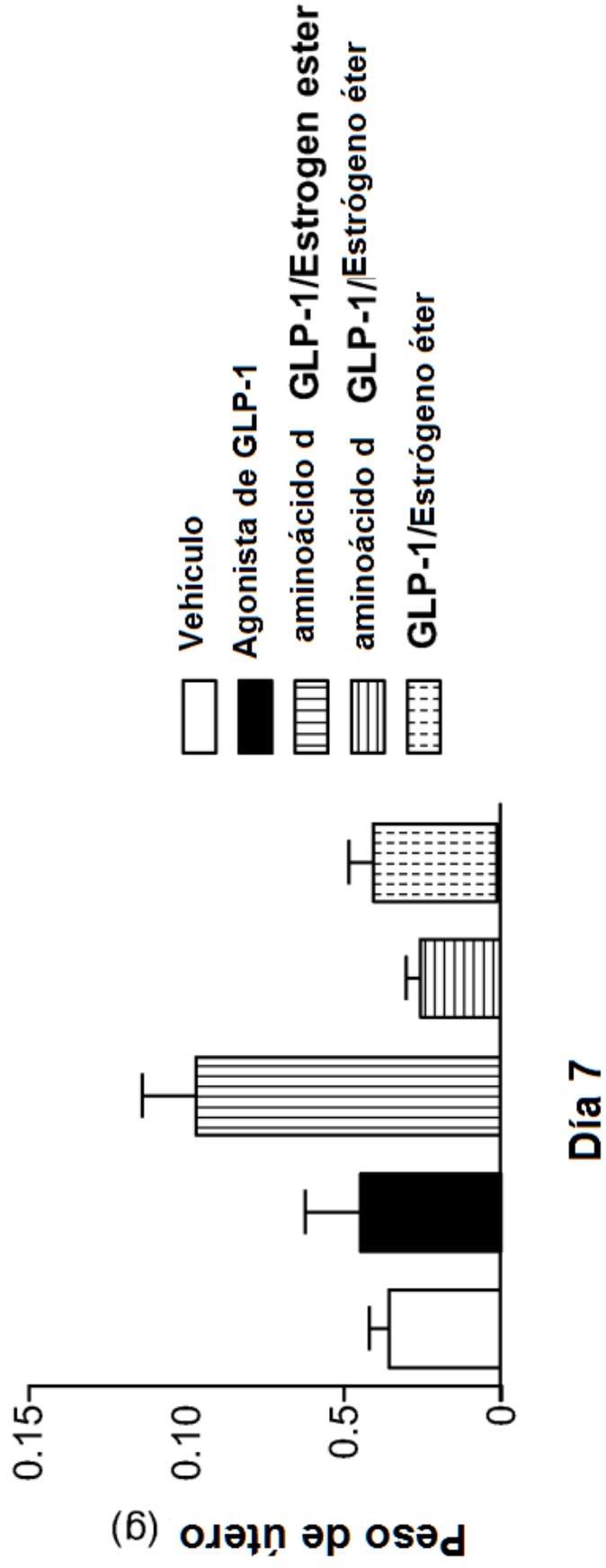


FIG. 13E

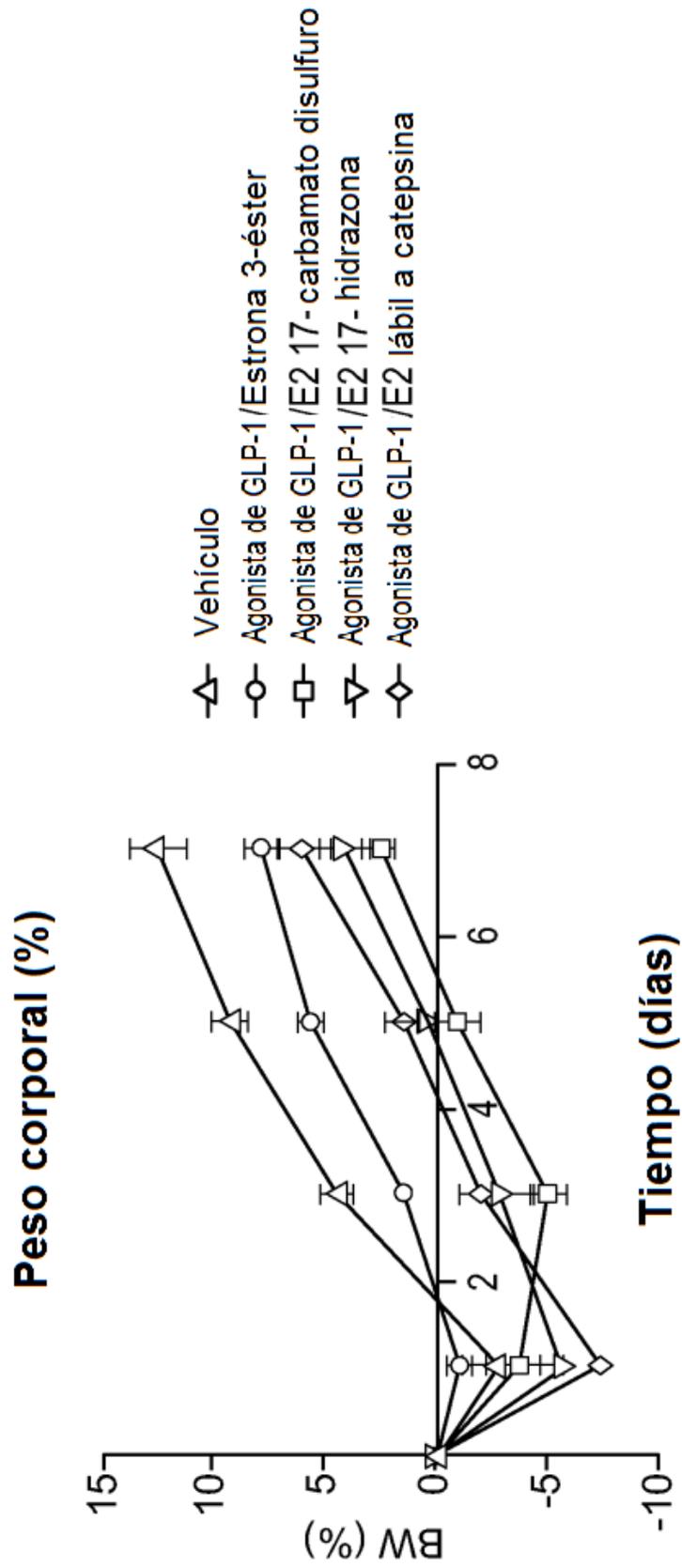


FIG. 14A

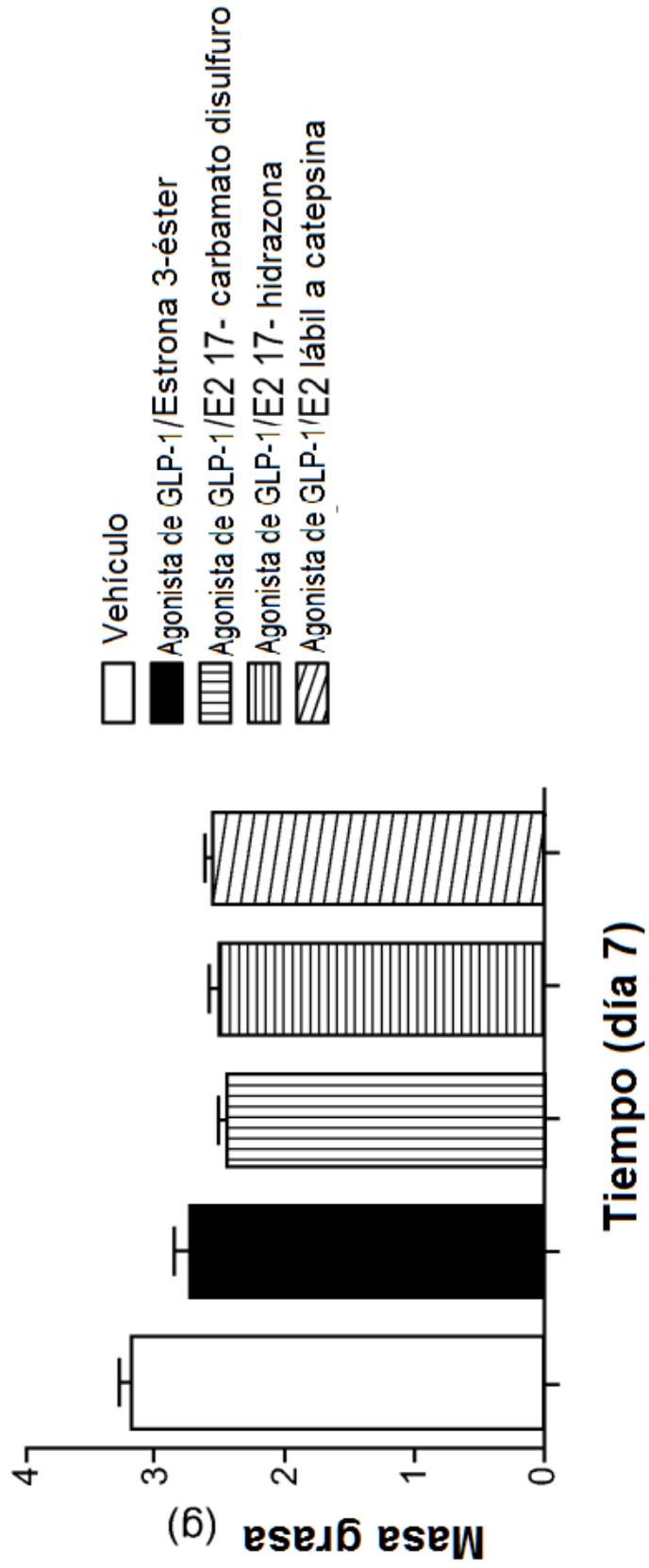


FIG. 14B

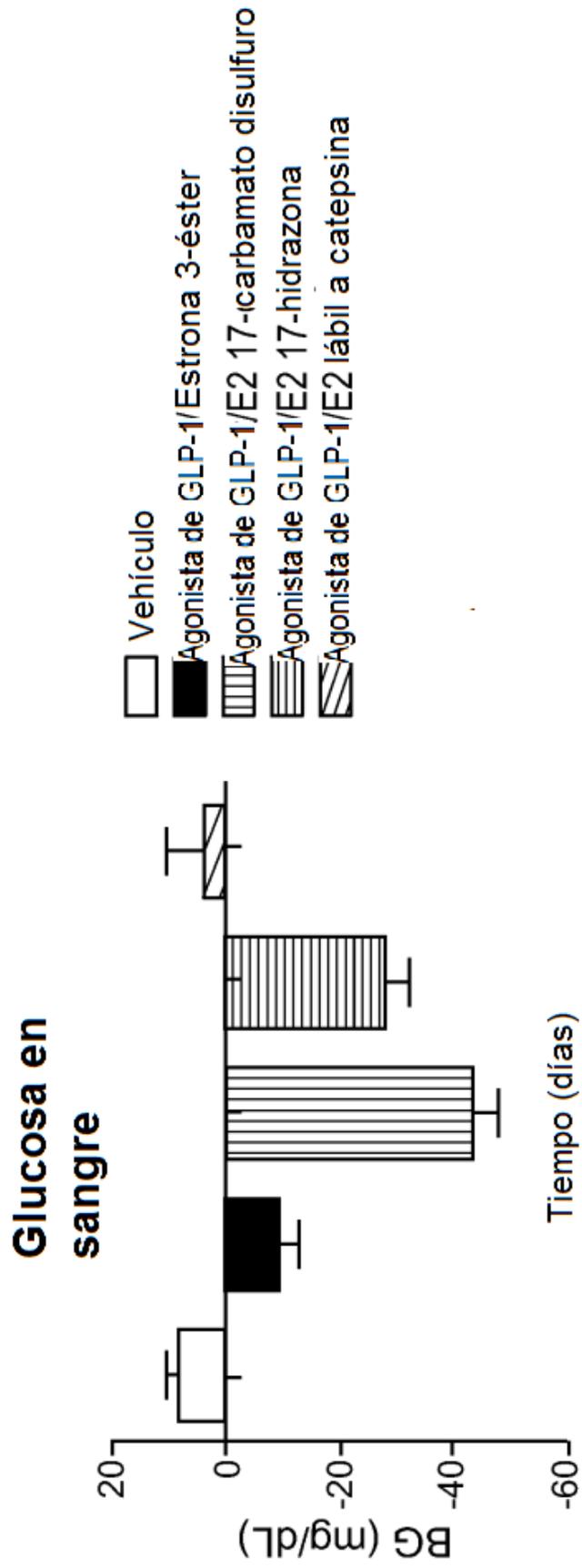


FIG. 14C

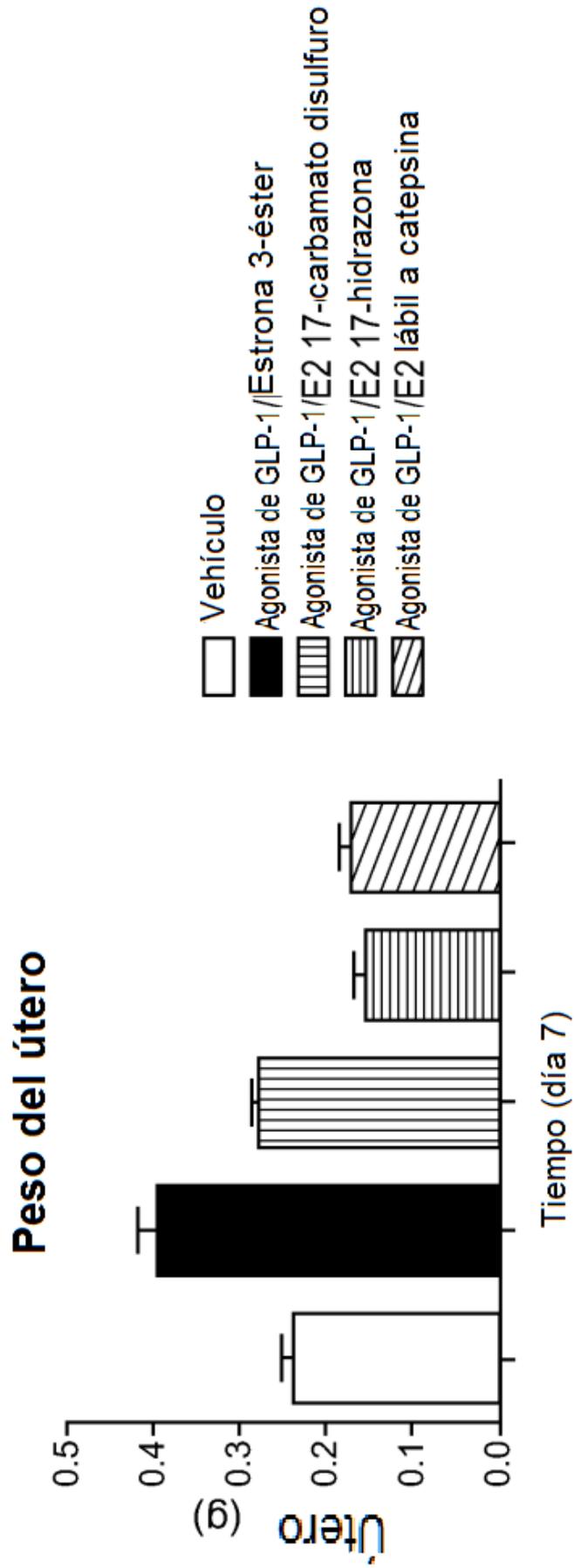
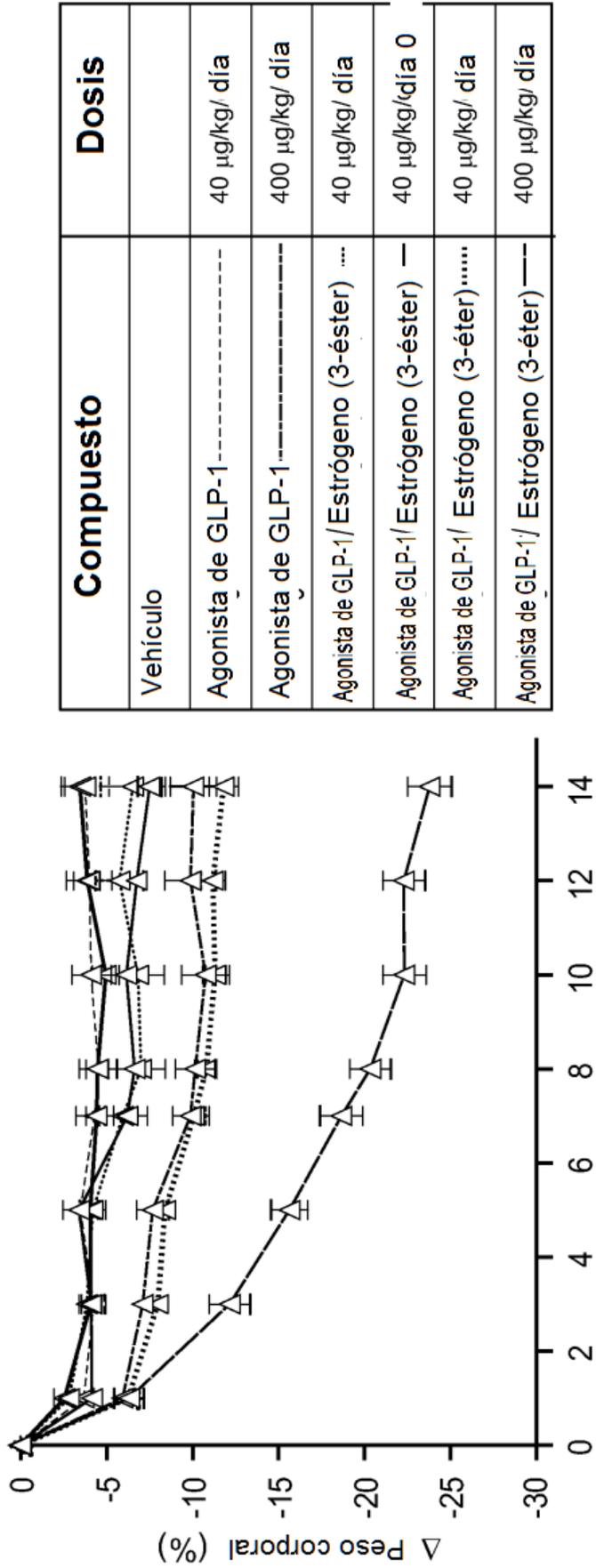


FIG. 14D



Tiempo (días)

FIG. 15A

Compuesto	Dosis
Vehículo	
Agonista de GLP-1	40 µg/kg/ día
Agonista de GLP-1	400 µg/kg/ día
Agonista de GLP-1/ Estrógeno (3-éster)	40 µg/kg/ día
Agonista de GLP-1/ Estrógeno (3-éster) —	40 µg/kg/día0
Agonista de GLP-1/ Estrógeno (3-éter)	40 µg/kg/ día
Agonista de GLP-1/ Estrógeno (3-éter)	400 µg/kg/ día

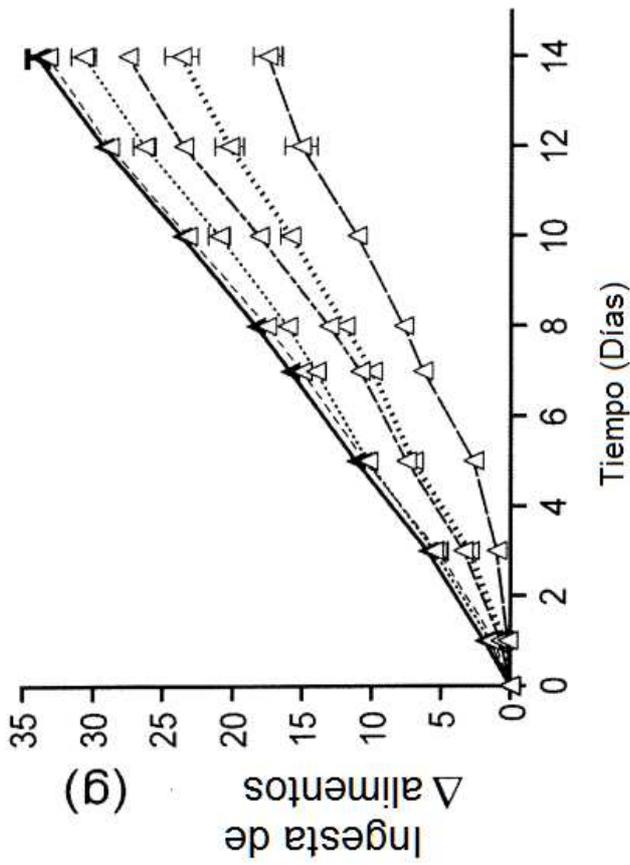
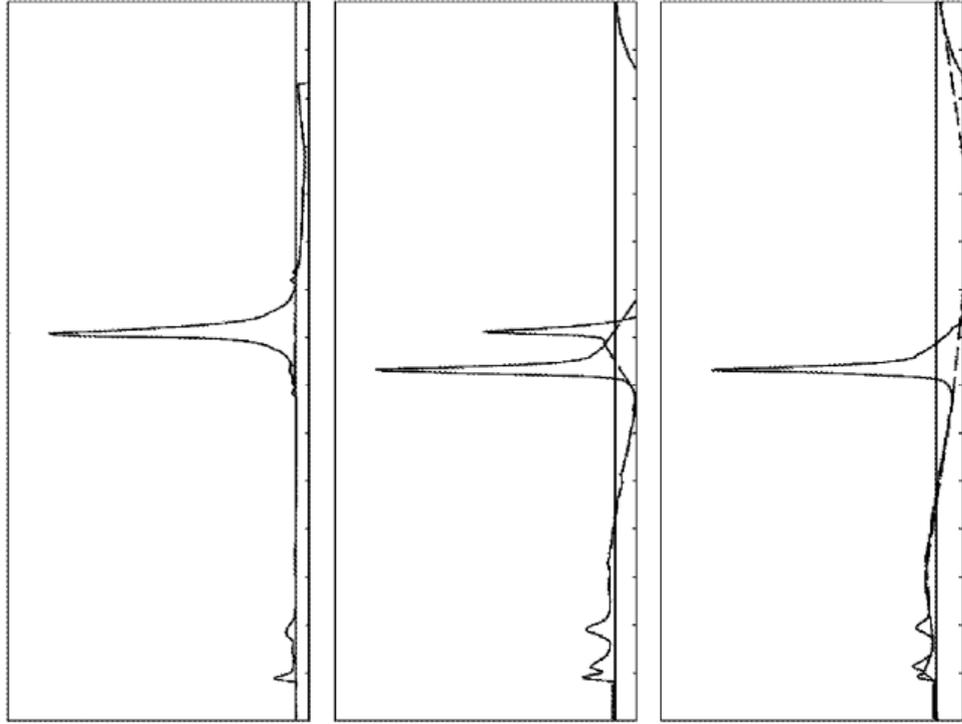


FIG. 15B

**GLP-1(Estrógeno (3-éster))
(lábil en estrógeno)**



**GLP-1/Estrógeno (3-éter)
(estable en estrógeno)**

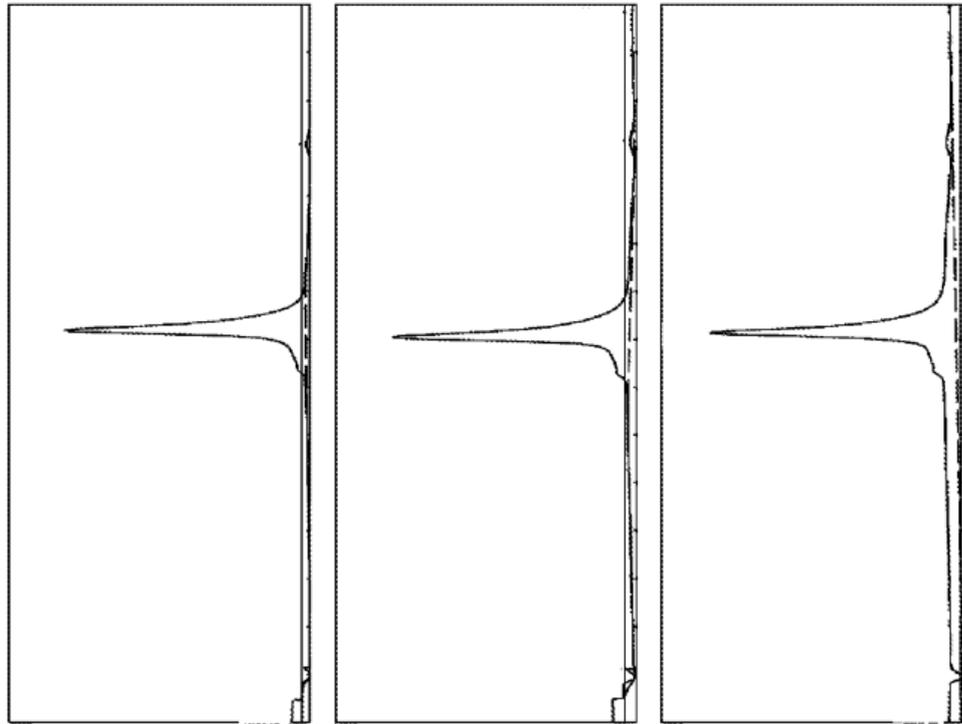


FIG. 16A

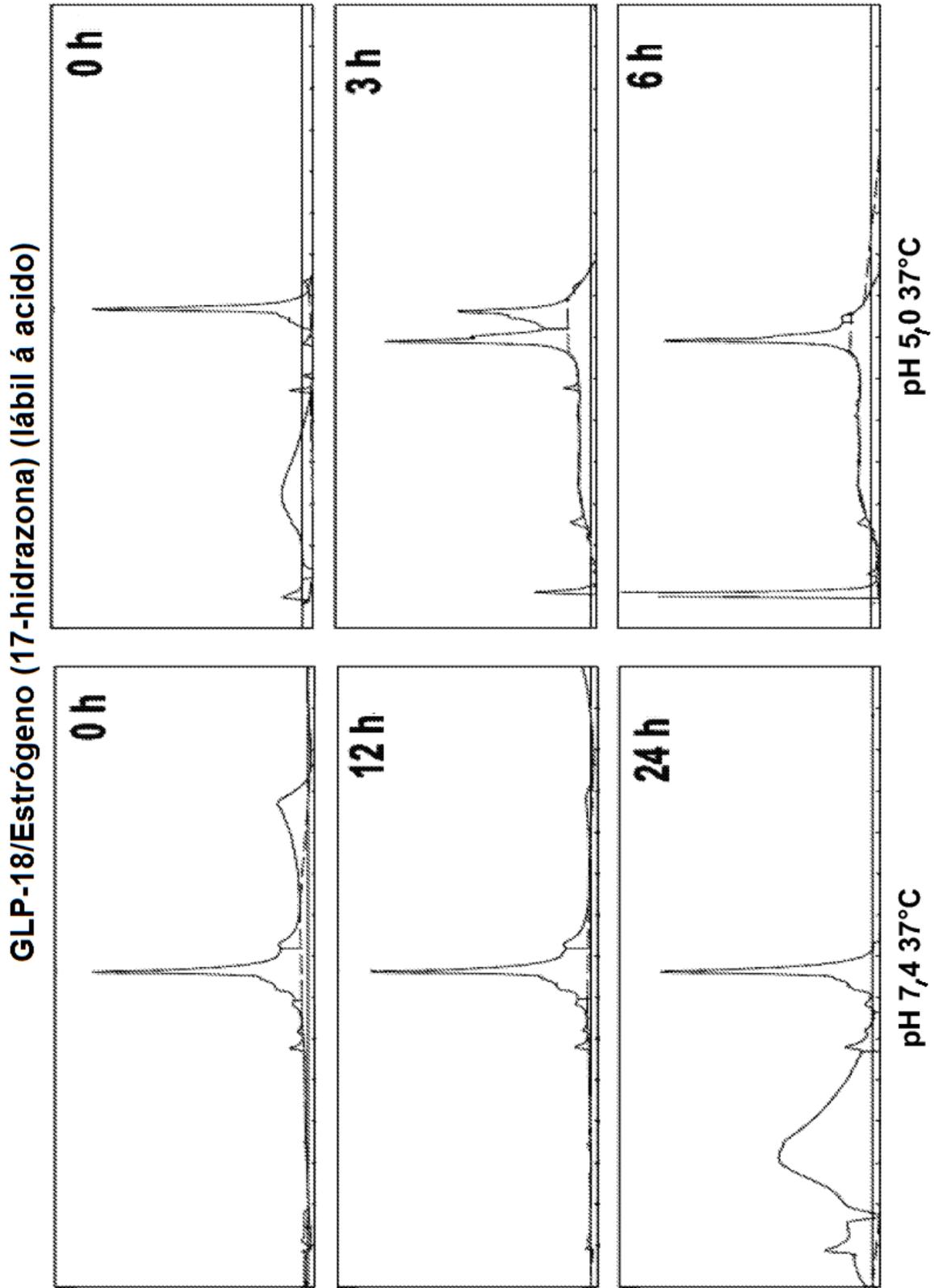


FIG. 16B

GLP-1/Estrógeno (17-carbamato disulfuro)

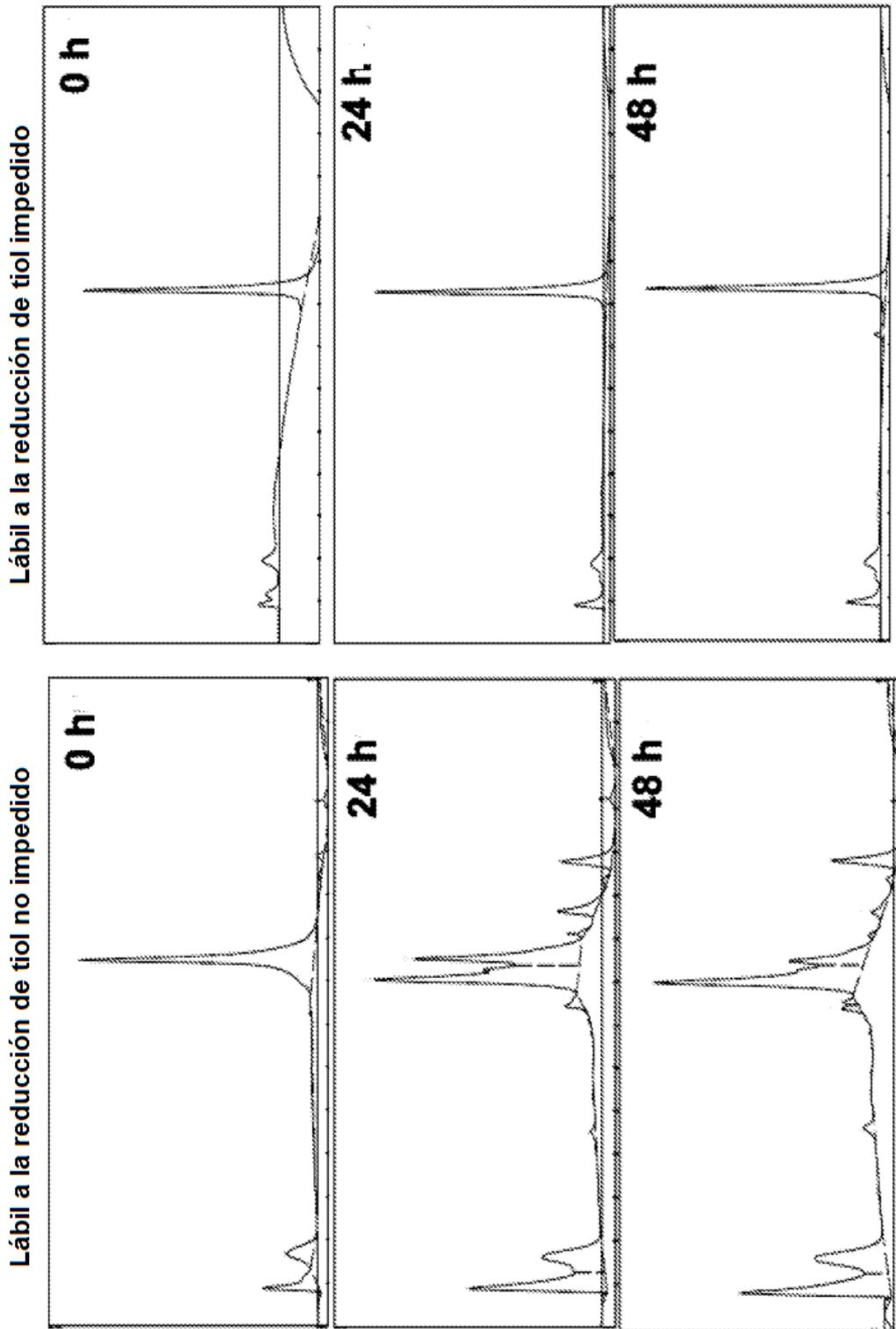


FIG. 16C

GLP-1/Estrógeno (17-carbamato disulfuro)
(lábil a la reducción de tiol impedido)

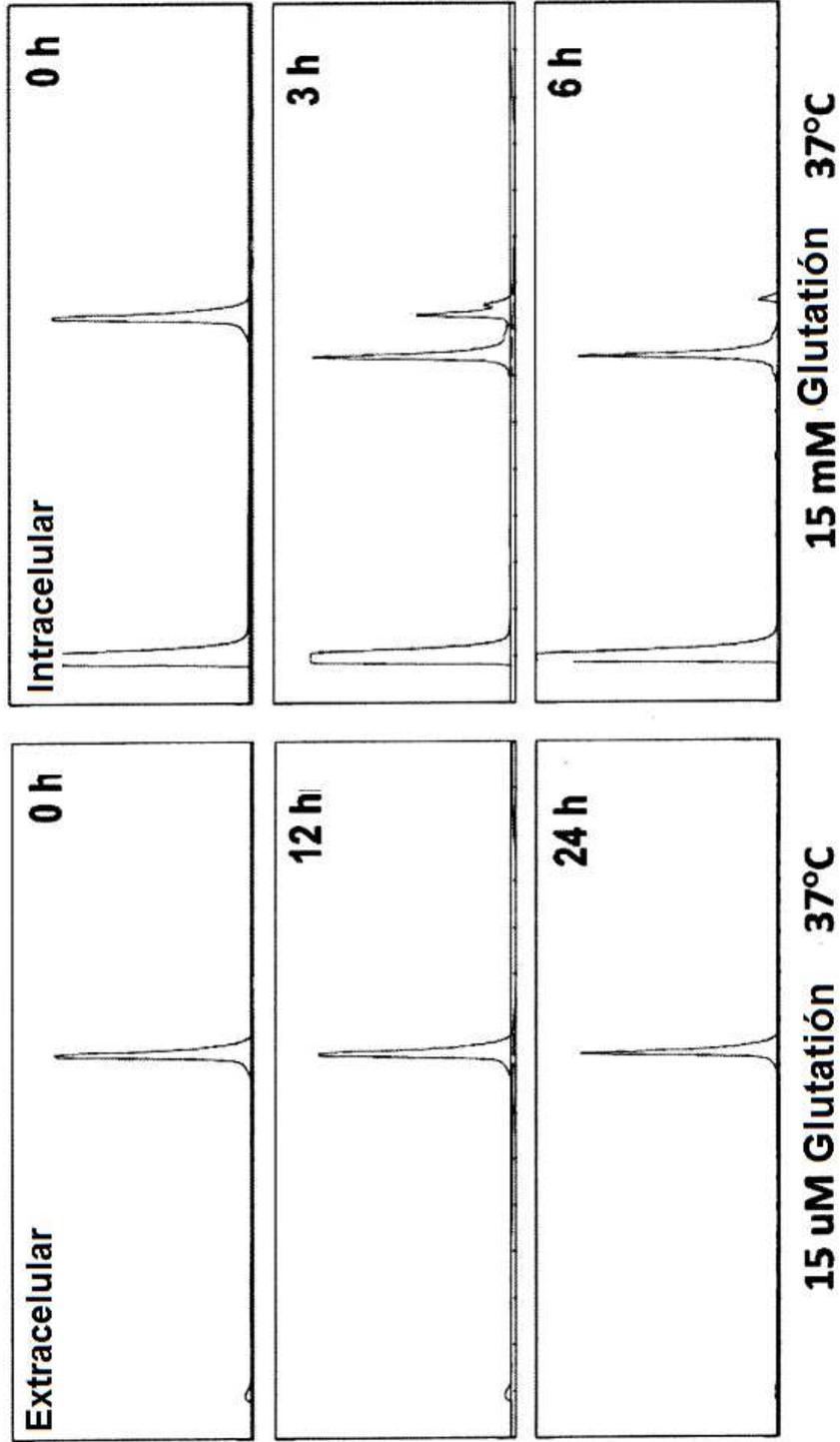
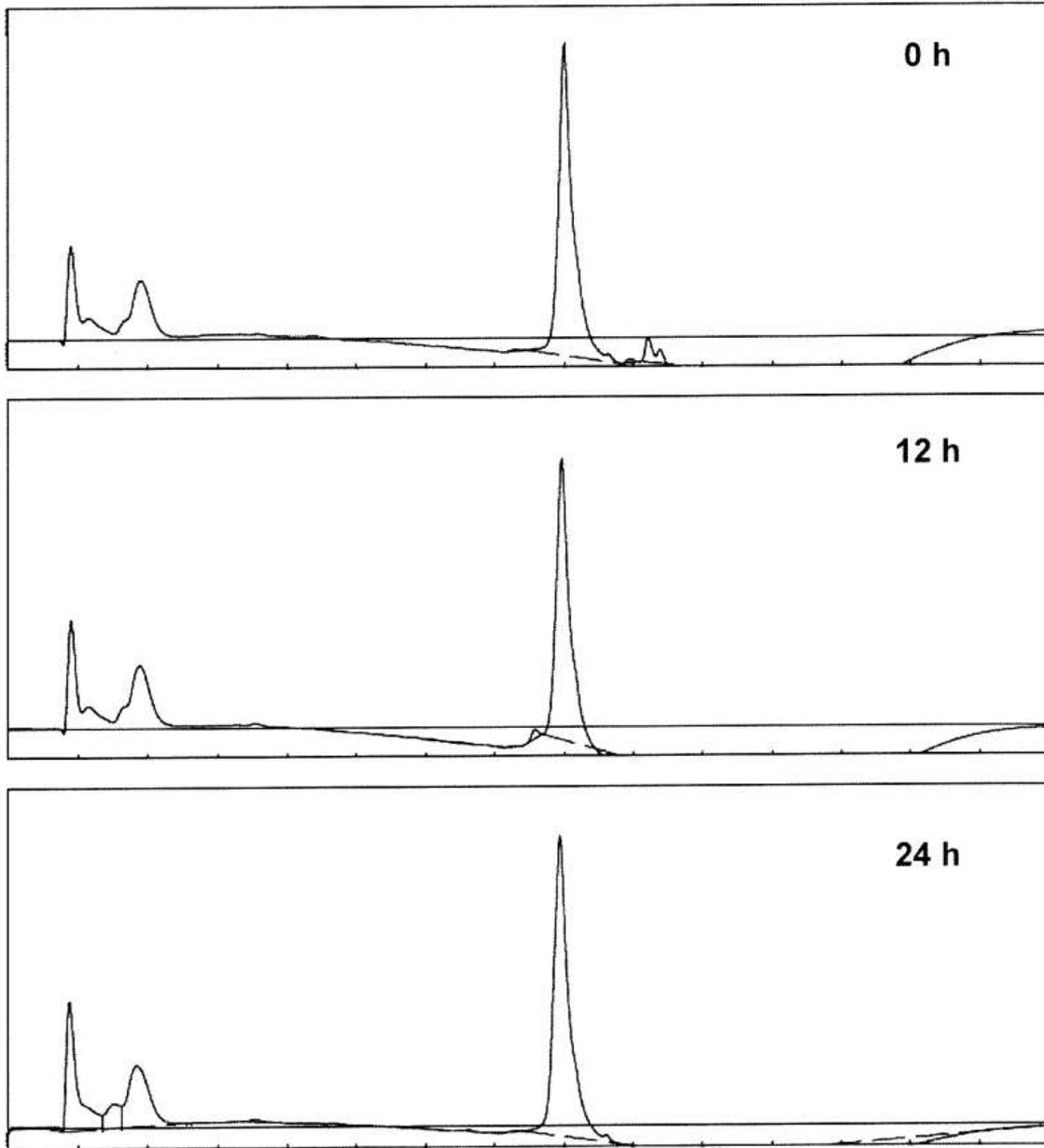


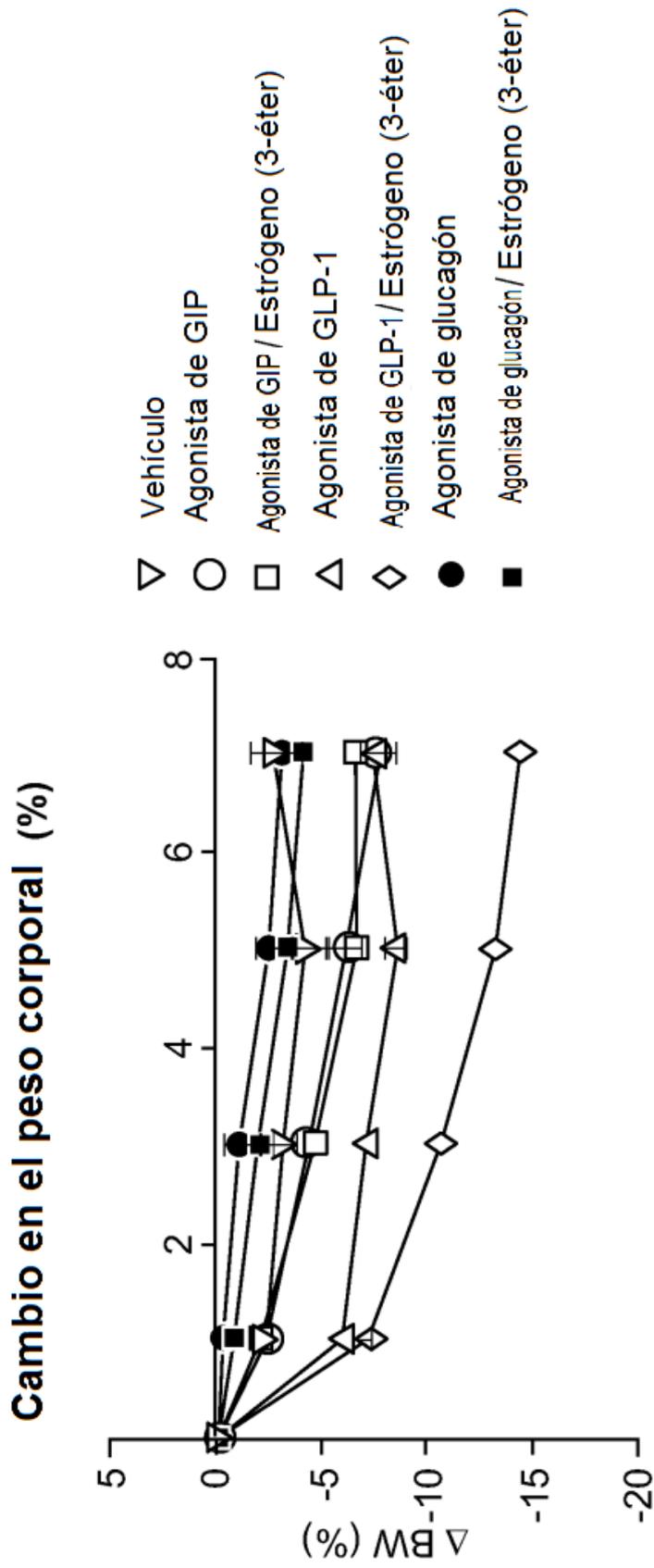
FIG. 16D

GLP-1/Estrógeno (catepsina)
(lábil a enzima)



Plasma humano 37°C

FIG. 16E



Tiempo (días)

FIG. 17A

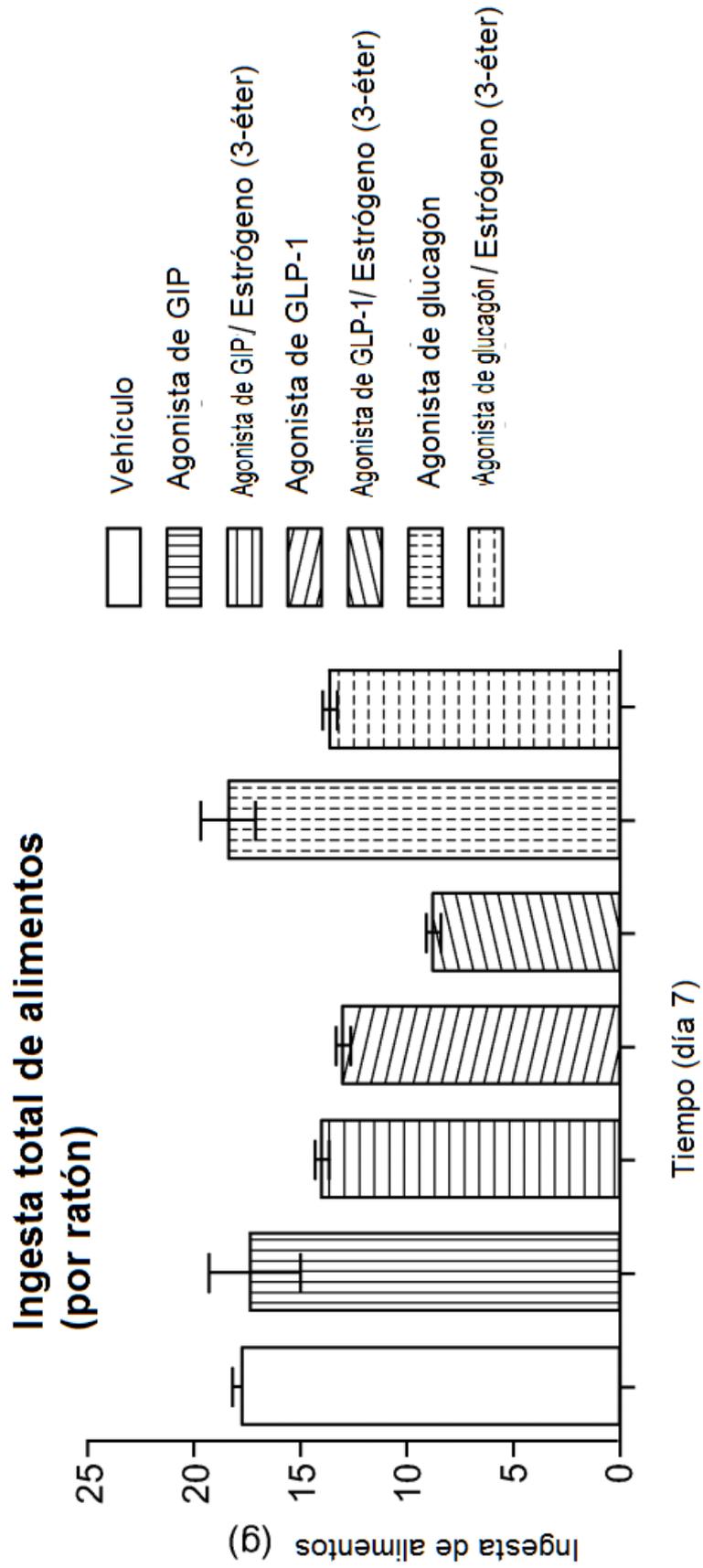


FIG. 17B

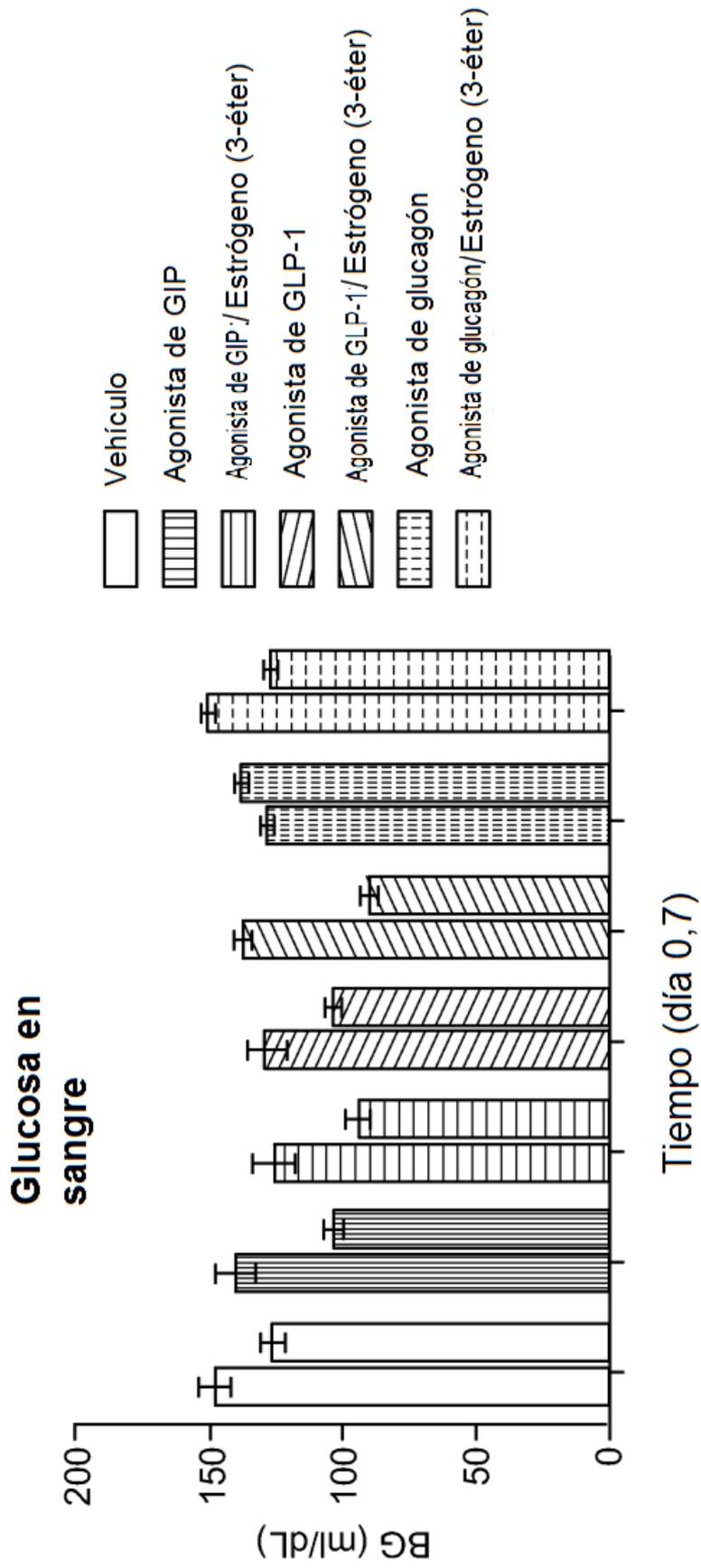


FIG. 17C

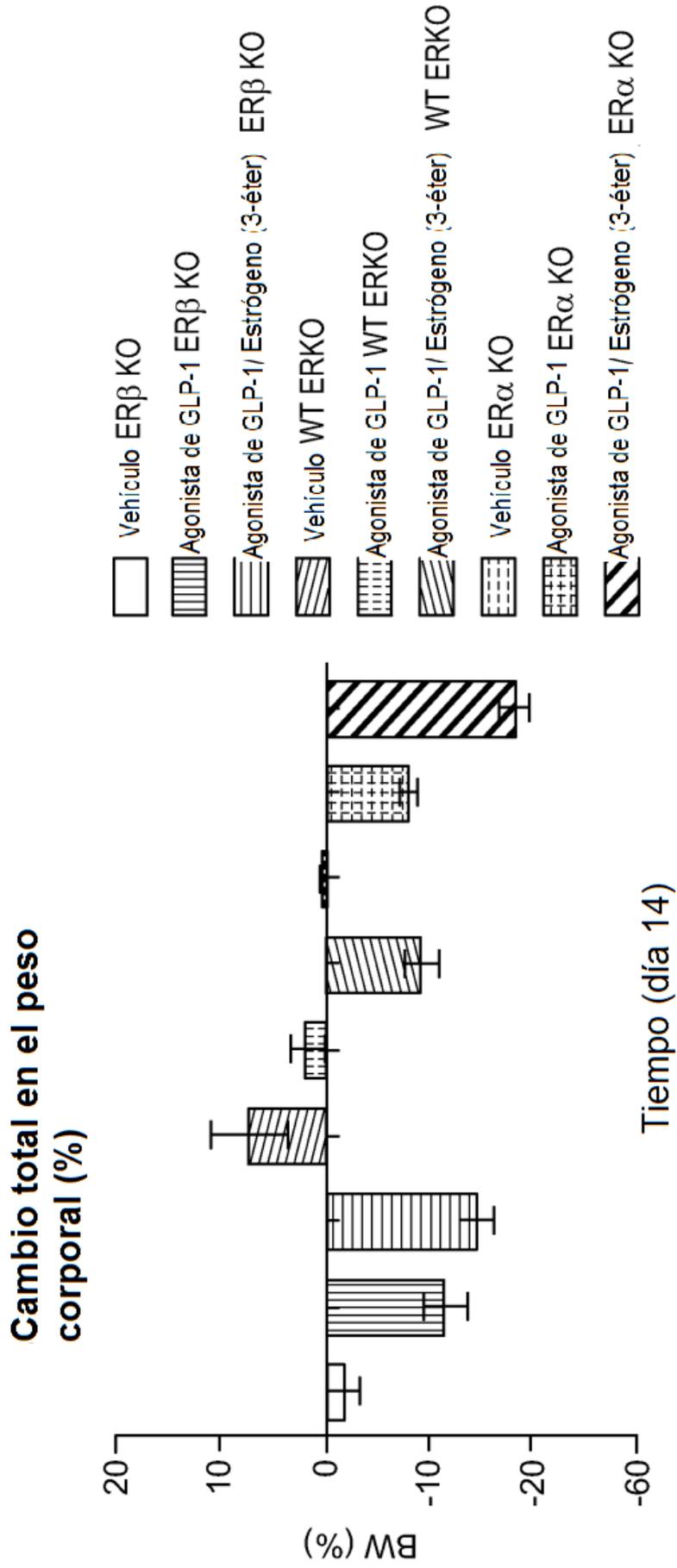


FIG. 18A

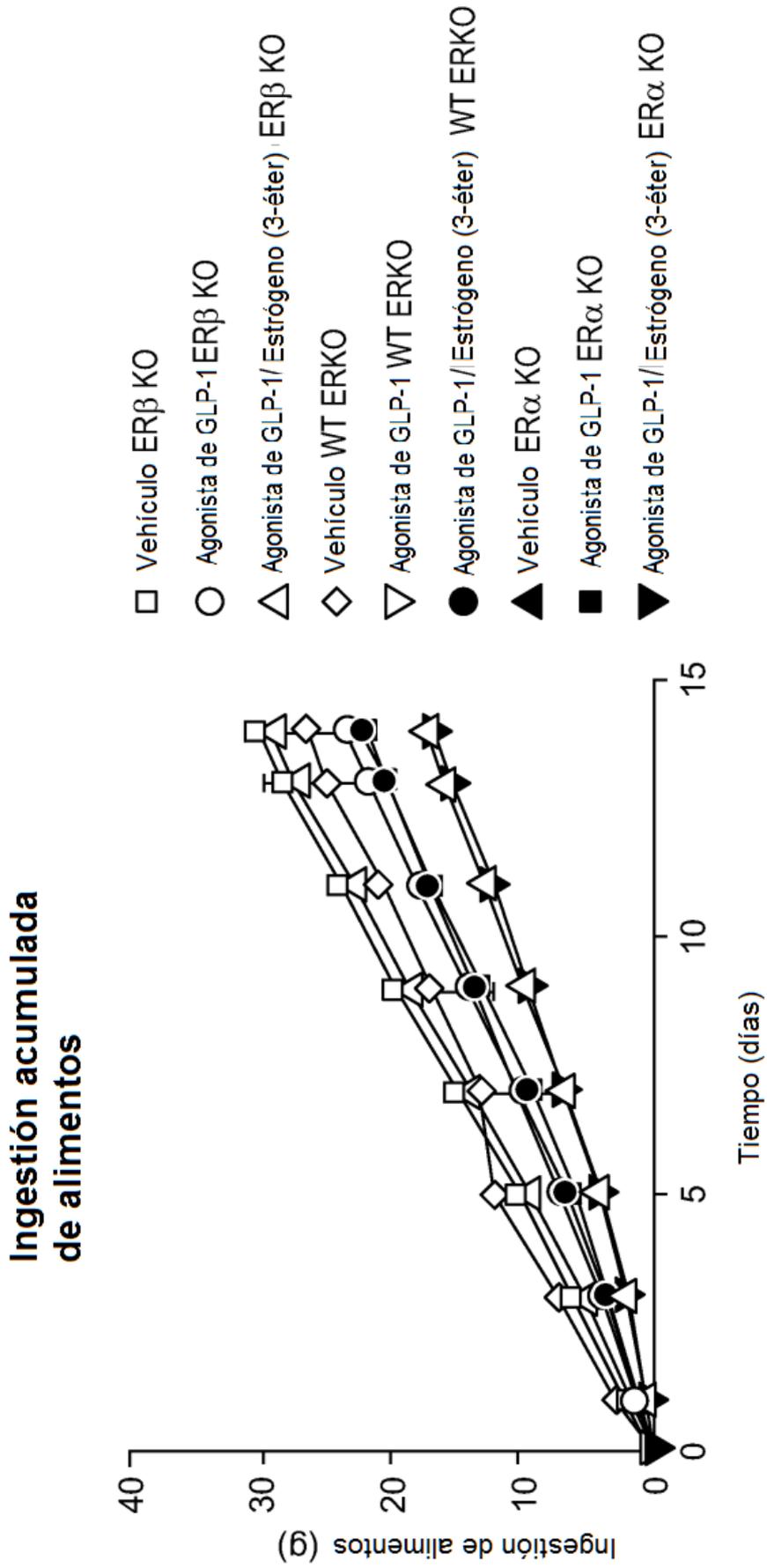


FIG. 18B

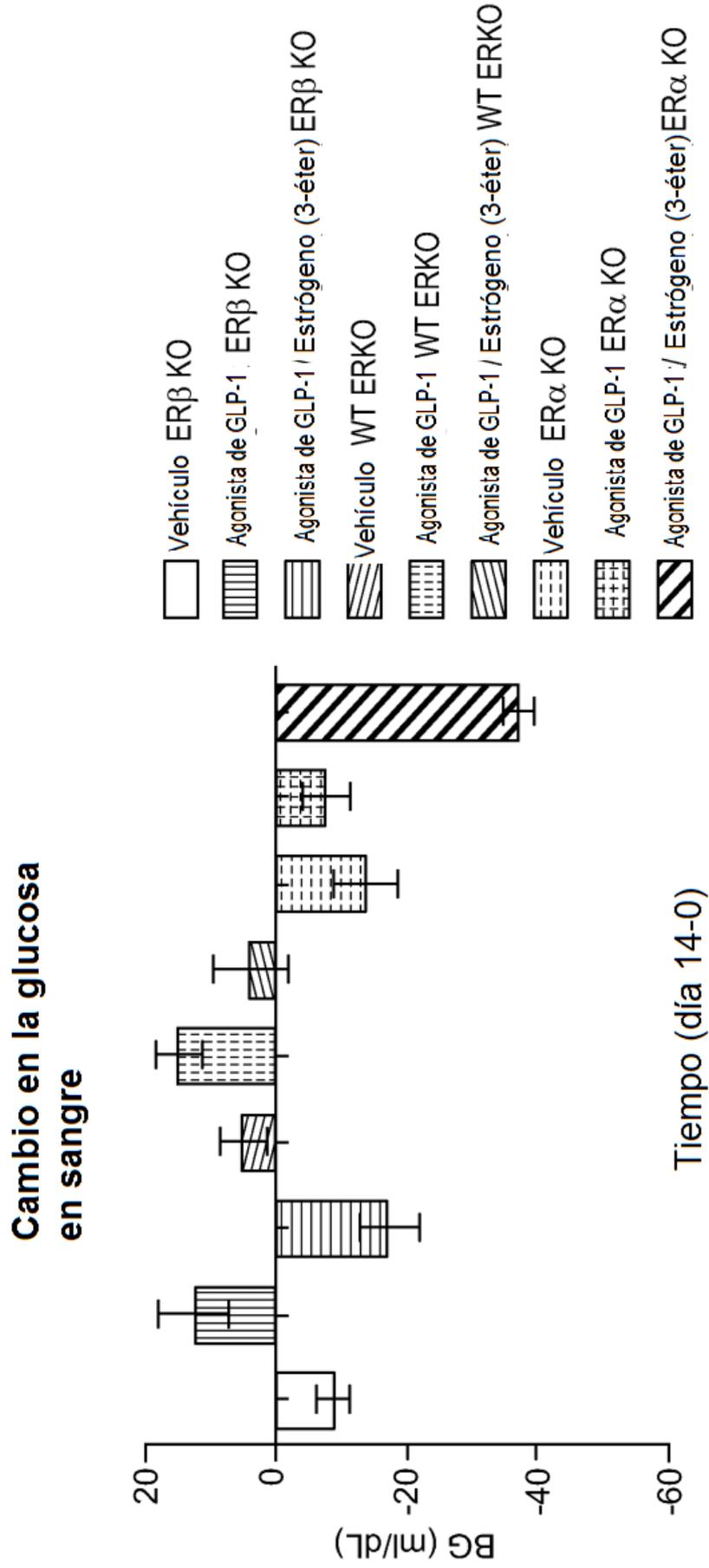


FIG. 18C

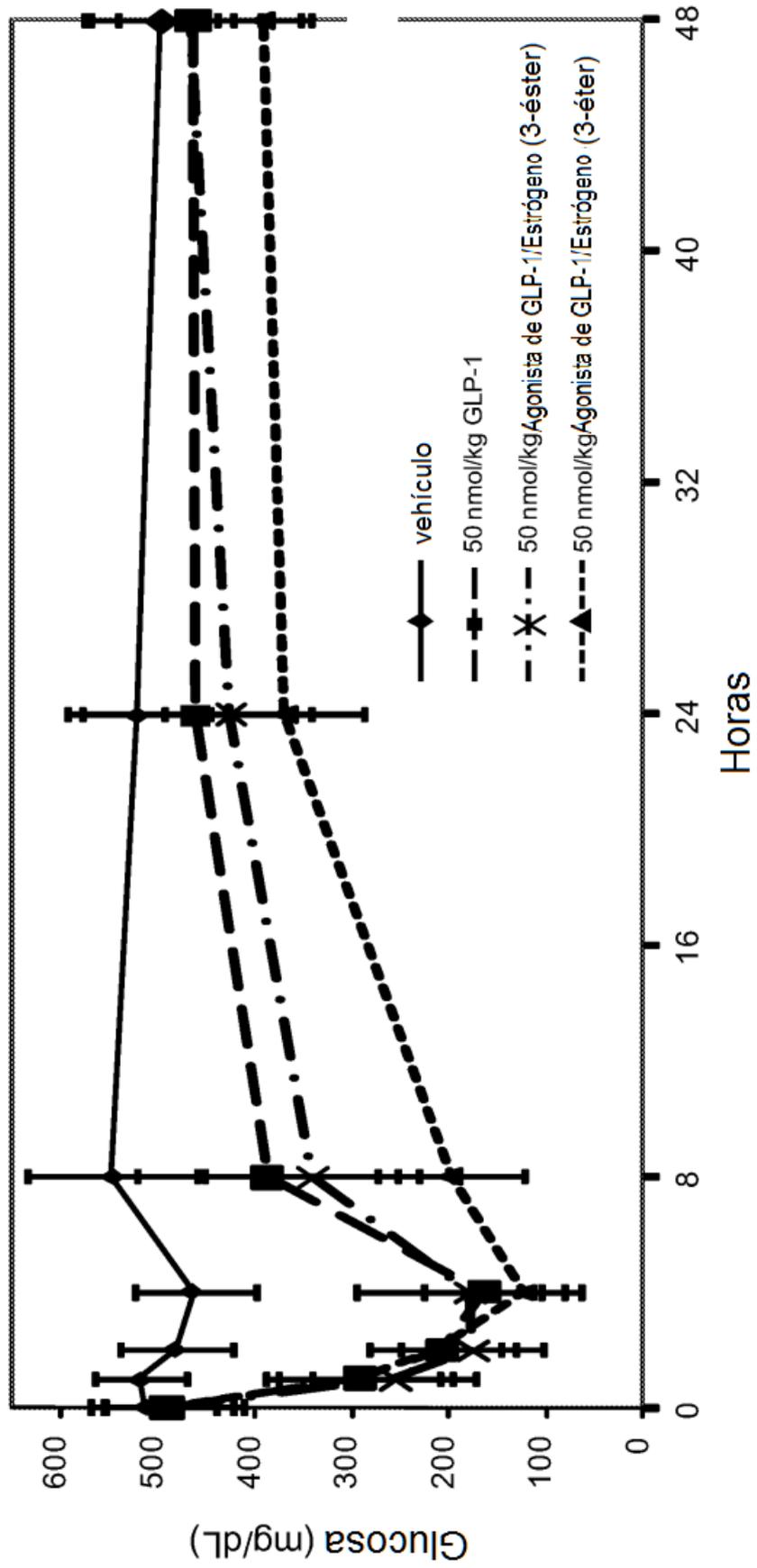


FIG. 19

Figura 20

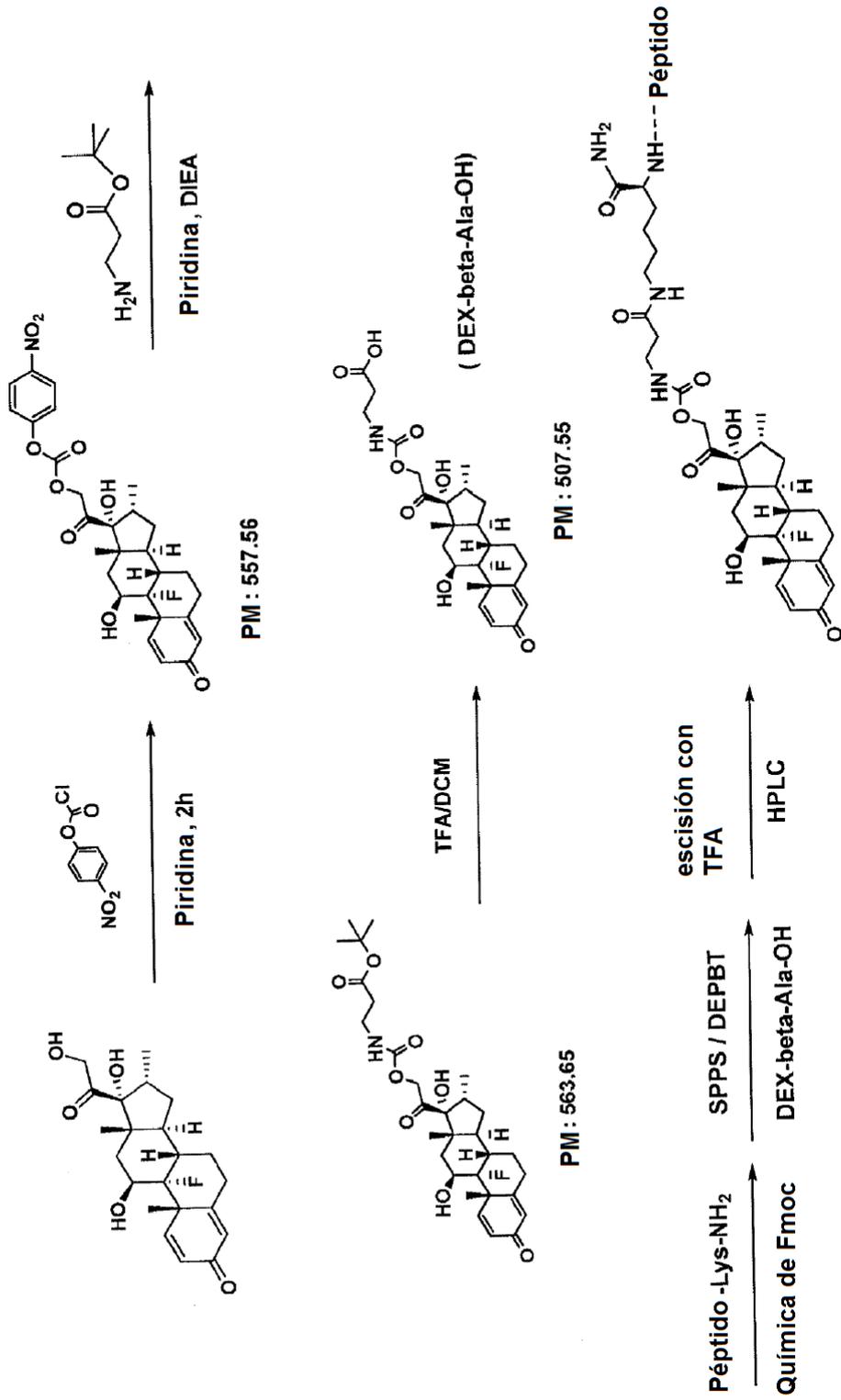


Figura 21

[Aib2, E16, K40(β -Ala-DEX)]GLP-1- CEX (1-40)

HaibEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGPSSGAPPPS K(β -Ala-DEX)- amida

Número de aminoácidos : 40

Peso molecular : 4680

pl teórico : 4.57

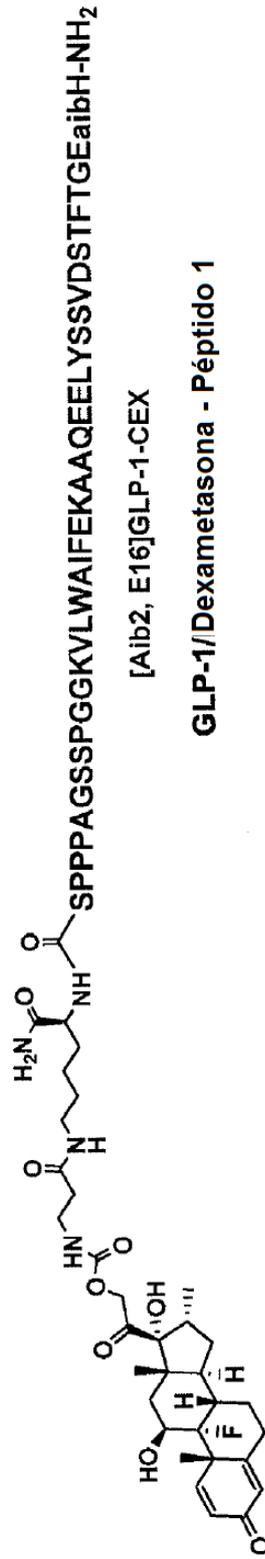


Figura 22

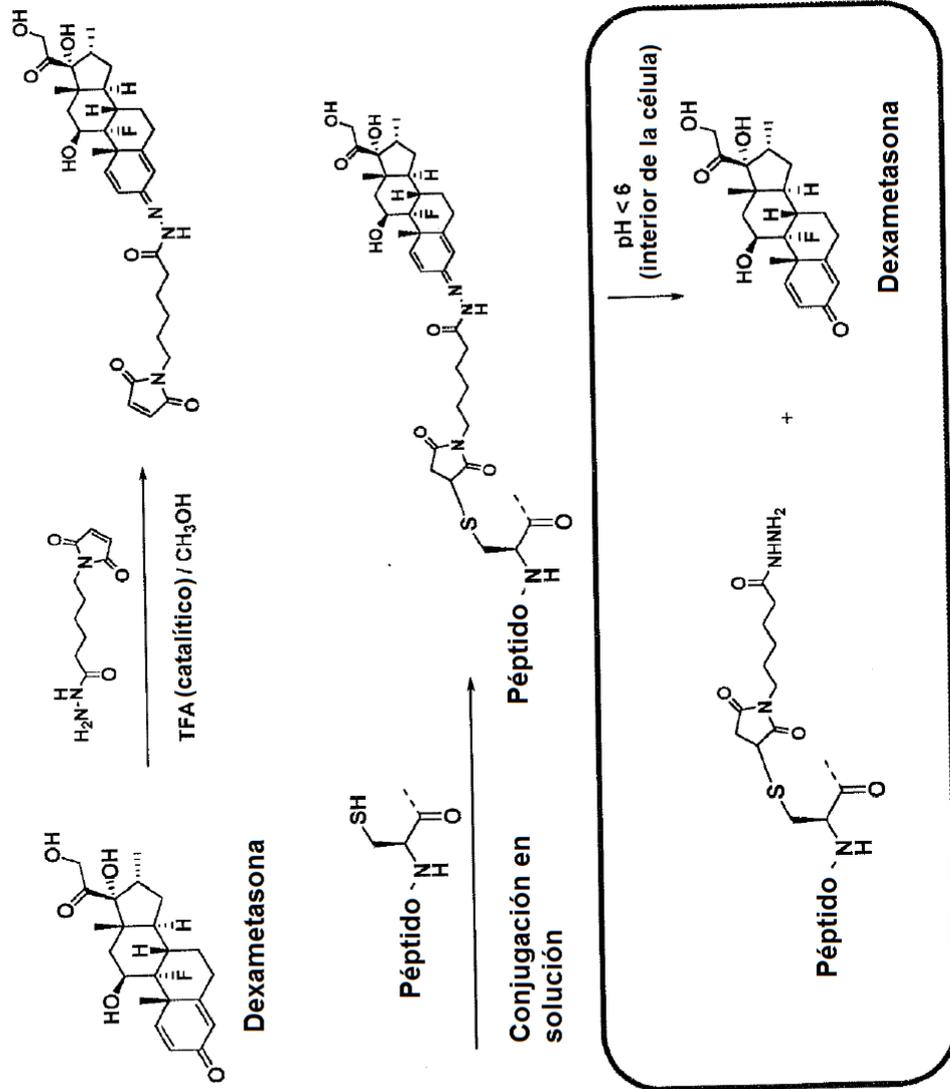


Figura 23

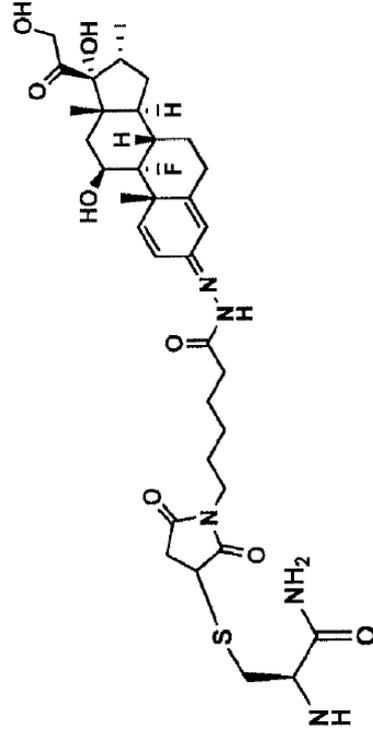
[Aib2, E16, C40(S-MAL-NHNH-DEX)]GLP-1- CEX (1-40)

HaibEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGPSSGAPPPS C(S-MAL-NHNH-DEX)-amida

Número de aminoácidos : 40

Peso molecular : 4765.5

pl teórico : 4.57



HaibEGTFTSDVSSYLEEQAAKEFIAWLKGGPSSGAPPPS-

GLP-1//Dexametasona - péptido 2

Figura 24

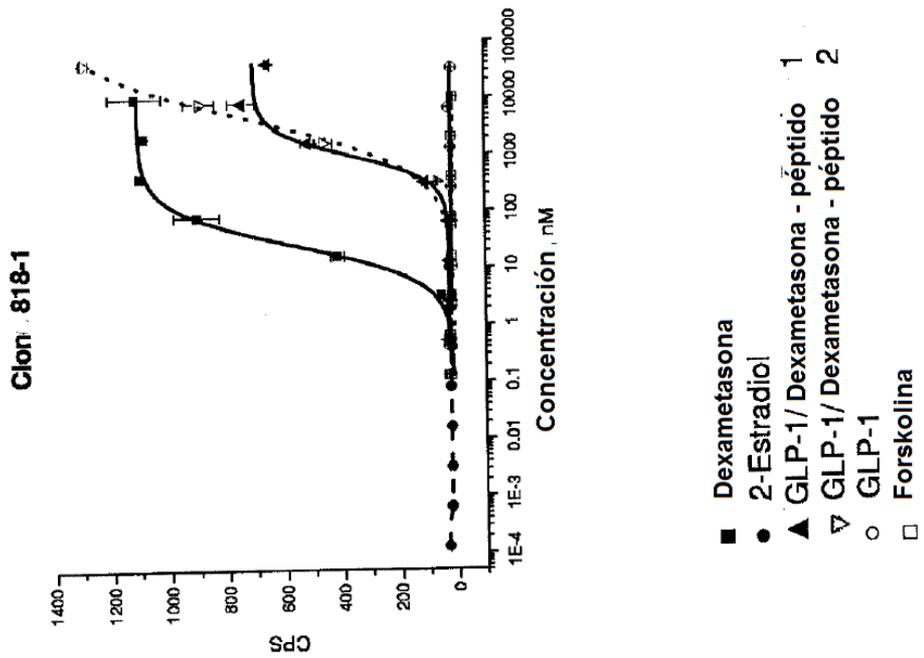
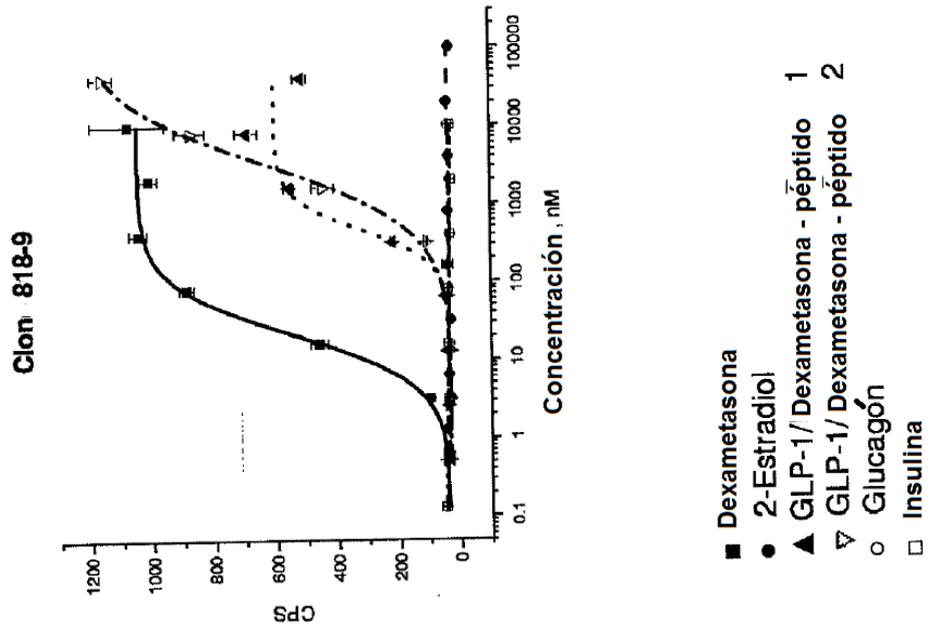


Figura 25A

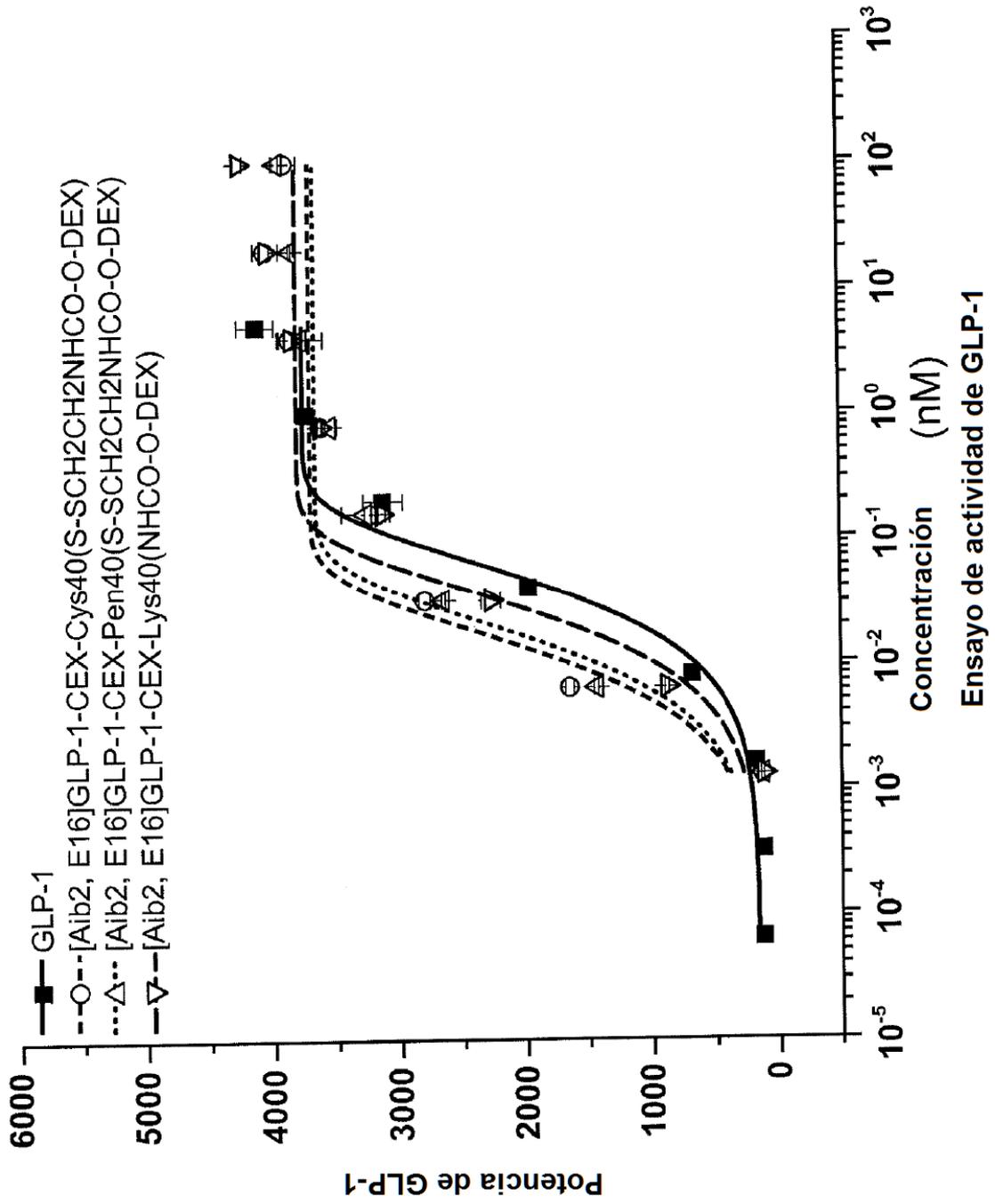
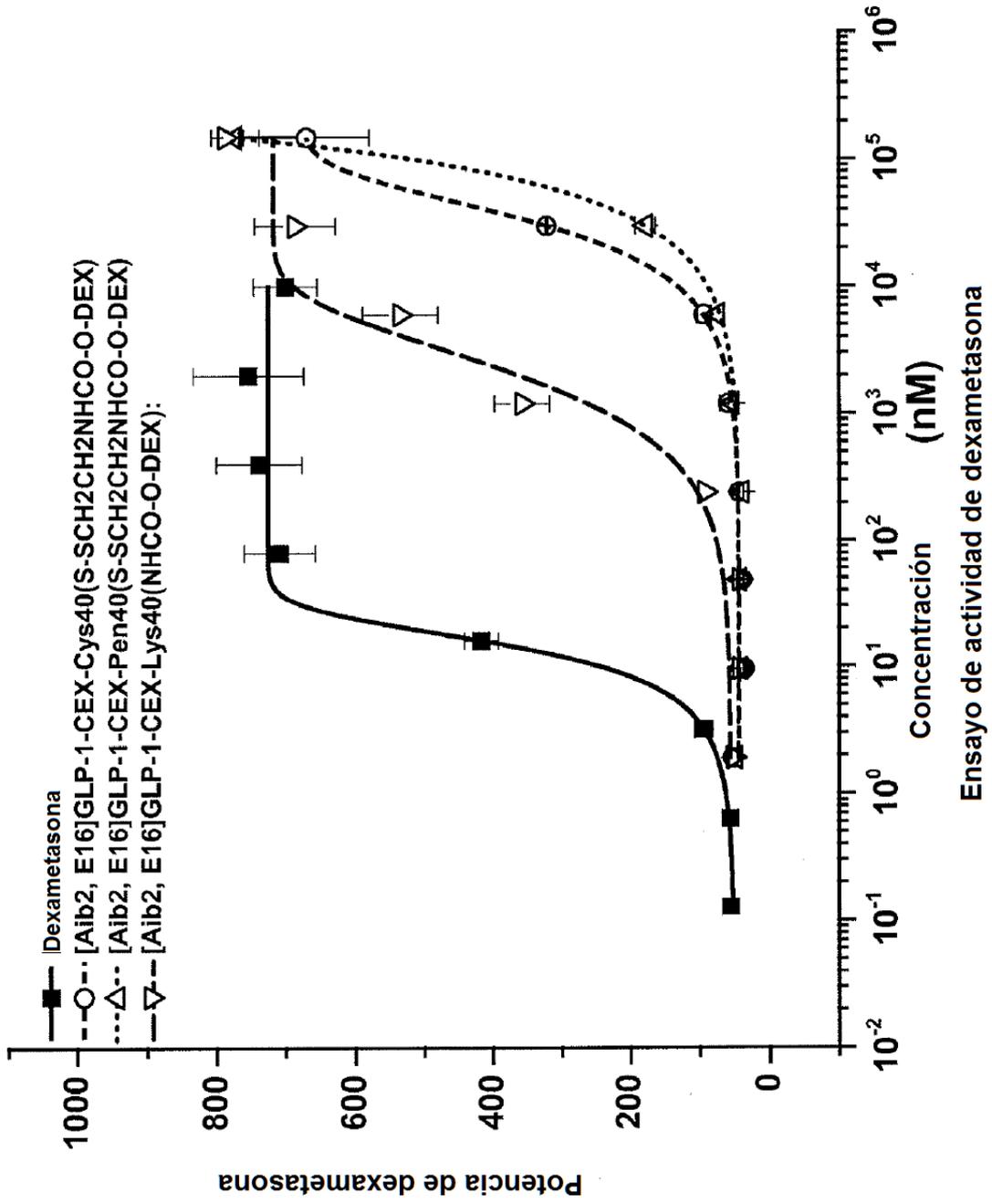


Figura 25B



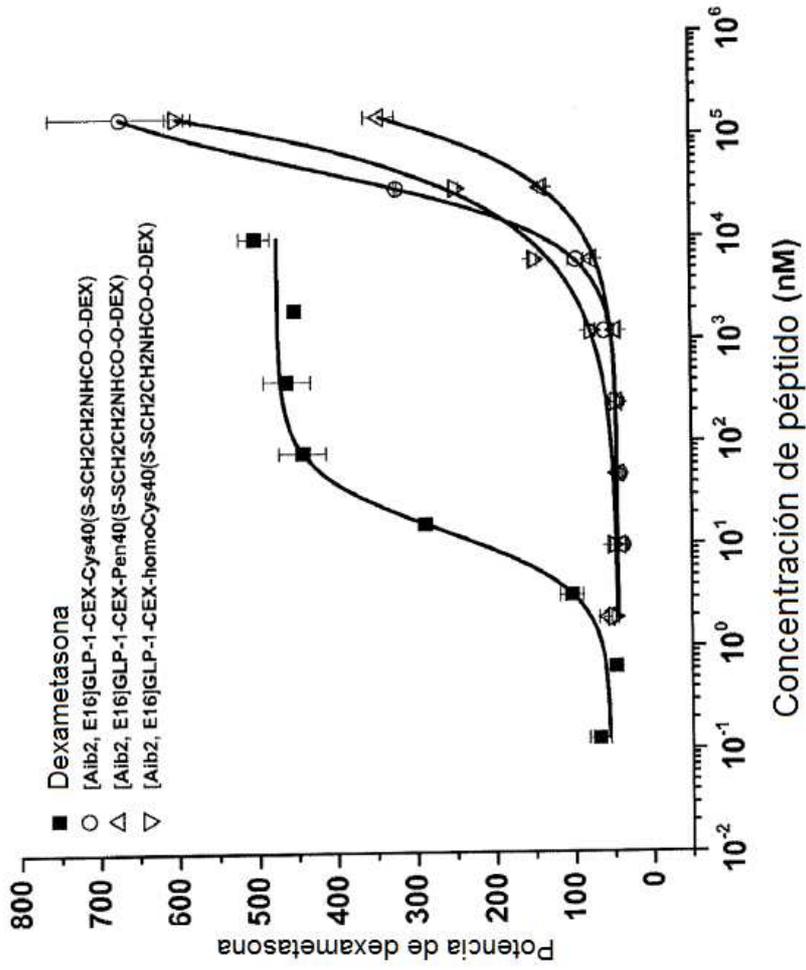


Figura 26

Dexametasona	EC50
[Aib2, E16]GLP-1-CEX-Cys40(S-SCH2CH2NHCO-O-DEX)	13.73nM
[Aib2, E16]GLP-1-CEX-Pen40(S-SCH2CH2NHCO-O-DEX)	45.48μM
[Aib2, E16]GLP-1-CEX-homoCys40(S-SCH2CH2NHCO-O-DEX)	73.35μM
[Aib2, E16]GLP-1-CEX-homoCys40(S-SCH2CH2NHCO-O-DEX)	65.38μM