(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 809 548**

(51) Int. CI.:

A61K 38/26 (2006.01)
C07K 14/605 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.10.2016 PCT/US2016/056959**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **04.05.2017 WO17074714**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.10.2016 E 16785667 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.06.2020 EP 3368060**

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

(30) Prioridad:

26.10.2015 US 201562246199 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2021

(73) Titular/es:

ELI LILLY AND COMPANY (100.0%)
Lilly Corporate Center
Indianapolis, IN 46285, US

(72) Inventor/es:

COSKUN, TAMER y
ALSINA-FERNANDEZ, JORGE

(74) Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

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

DESCRIPCIÓN

Agonistas del receptor de glucagón

La presente invención se refiere a compuestos con una duración de acción prolongada en el receptor de glucagón en comparación con el glucagón nativo. Se proporcionan específicamente agonistas del receptor de glucagón con modificaciones a la estructura del glucagón nativo que se introduce para agonizar selectivamente el receptor de glucagón durante un período prolongado de tiempo. Los agonistas del receptor de glucagón pueden ser útiles en combinación con otros agentes terapéuticos para tratar trastornos como la diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) y/o la obesidad, o como monoterapias para tratar una variedad de trastornos, como la obesidad, la enfermedad del hígado graso no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis no alcohólica (NASH), dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia y/o hipoglucemia nocturna, así como síndrome de hígado graso en vacas lecheras.

En las últimas décadas, la prevalencia de diabetes ha seguido aumentando. La DMT2 es la forma más común de diabetes que representa aproximadamente el 90 % de todas las diabetes. La DMT2 se caracteriza por altos niveles de glucosa en sangre causados por la resistencia a la insulina. El estándar actual de atención para la DMT2 incluye dieta y ejercicio, y tratamiento con medicamentos orales y medicamentos inyectables para reducir la glucosa, lo que incluye las terapias que se basan en incretinas, como los agonistas del receptor del péptido similar al glucagón-1 (GLP-1) y los inhibidores de dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). Cuando el tratamiento con medicamentos orales y terapias que se basan en incretina son insuficientes, se considera el tratamiento con insulina. Los pacientes cuya enfermedad ha progresado hasta el punto de que se requiere terapia con insulina generalmente comienzan con una inyección diaria única de insulina basal de acción prolongada, aunque en algunos casos se pueden incluir inyecciones de insulina de acción rápida a la hora de las comidas, según sea necesario.

A pesar de la disponibilidad de estas terapias, los niveles de glucosa en sangre en muchos pacientes con DMT2 se siguen controlando inadecuadamente. La diabetes no controlada conduce a varias enfermedades que afectan la morbilidad y la mortalidad de los pacientes. Uno de los principales factores de riesgo para la DMT2 es la obesidad. La mayoría de los pacientes con DMT2 (~90 %) tienen sobrepeso u obesidad. Está documentado que una disminución en la adiposidad corporal conducirá a una mejora en las comorbilidades asociadas a la obesidad, lo que incluye la hiperglucemia y los eventos cardiovasculares. Por lo tanto, se necesitan terapias efectivas en el control de la glucosa y la reducción de peso para un mejor manejo de la enfermedad.

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

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

Otros péptidos que se derivan del pre-proglucagón incluyen GLP-1, péptido similar al glucagón-2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM). GLP-1 es un péptido de 36 aminoácidos, cuyo principal fragmento biológicamente activo ($GLP\text{-}1_{7\text{-}36}$) se produce como un péptido C-terminal amidado de 30 aminoácidos que corresponde con los aminoácidos 98 a 127 del pre-proglucagón, que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR (SEQ ID NO: 2). Mientras que el glucagón estimula la liberación de glucosa para prevenir la hipoglucemia, GLP-1 (SEQ ID NO: 2) estimula la síntesis y secreción de insulina y se ha demostrado que previene la hiperglucemia en los diabéticos. Actualmente se encuentra disponible una variedad de análogos de GLP-1, que incluyen exenatida, liraglutida, albiglutida y dulaglutida.

OXM es un péptido de 37 aminoácidos compuesto por la secuencia completa de 29 aminoácidos de glucagón con una extensión octapeptídica de carboxilo terminal (aminoácidos 82 a 89 del pre-proglucagón y que se denomina

"péptido interviniente 1" o IP-1), que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA (SEQ ID NO: 3). OXM activa los receptores de glucagón y GLP-1, con una potencia ligeramente mayor para el receptor de glucagón sobre el receptor de GLP-1. Se han descrito análogos de OXM que tienen actividad dual de receptor de glucagón y receptor de GLP-1. *Véase, por ejemplo,* WO2011087672; WO2011087671.

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

Además, similar a la actividad dual de OXM que se describe anteriormente, se ha descrito que ciertos análogos de glucagón tienen actividad coagonista tanto en el receptor de glucagón como en uno o más de los receptores GLP-1 o GIP. Por ejemplo, los documentos WO2011075393 y WO 2012177444, pretenden describir los análogos de glucagón que tienen actividad tanto en los receptores de glucagón como de GLP-1. De manera similar, el documento WO2013192130 pretende describir los análogos de glucagón que también tienen actividad en el receptor GIP. Más aún, WO2015067716 pretende describir análogos que tienen actividad agonista triple en cada uno de los receptores de glucagón, GLP-1 y GIP.

A pesar de la variedad de péptidos y proteínas propuestos como DMT2 y/o terapias contra la obesidad, las terapias actualmente disponibles y/o en desarrollo tienen limitaciones. En particular, aunque se puede afirmar que los agonistas duales o triples descritos anteriormente proporcionan las propiedades reductoras de glucosa de un agonista del receptor GLP-1 y/o del receptor GIP junto con los beneficios metabólicos de un agonista del receptor de glucagón, los niveles de actividad de dichos péptidos en cada uno de los diversos receptores que agonizan están fijos, lo que dificulta lograr un equilibrio ideal de activación del receptor para obtener, *in vivo*, una alta eficacia con efectos secundarios mínimos. Y las terapias que no involucran agonismo del receptor de glucagón carecen de los beneficios metabólicos potenciales de dicho mecanismo de acción.

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

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

Los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención buscan satisfacer estas necesidades. Por consiguiente, la presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón con una duración de acción prolongada, lo que permite la dosificación con poca frecuencia como una vez al día, tres veces a la semana, dos veces a la semana o una vez a la semana. La presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón con una actividad óptima y selectiva en el receptor de glucagón en comparación, por ejemplo, con los receptores GLP-1 y/o GIP. La presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón que tienen características físicas y químicas adecuadas para uso crónico y co-formulación con otros tratamientos. La presente invención proporciona agonistas del receptor de glucagón que, cuando se usan en combinación con otros tratamientos para la diabetes, dan como resultado un control mejorado de la glucosa, beneficios metabólicos, tales como la reducción del peso corporal y/o beneficios lipídicos, tales como la reducción de PCSK9, cuando se usan en combinación con otros tratamientos para la diabetes. En particular, las combinaciones de agonistas del receptor de glucagón de la presente invención con agonistas de GLP-1R o coagonistas de GIP-GLP-1 tienen efectos sinérgicos beneficiosos en medidas tales como pérdida de peso y composición corporal. La presente invención también busca proporcionar tratamientos efectivos para otros trastornos cuando se usa como monoterapia y/o en combinación con otras terapias, que incluye obesidad, NAFLD, NASH, dislipidemia, trastorno metabólico, hiperinsulinemia y/o hipoglucemia nocturna.

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ [Fórmula I]

en la que

X_1 es Aib;

X_2 es T o L;

X_3 es Aib;

X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-}CO\text{-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$, en el que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;

X_5 es E o A;

X_6 es T o E;

X_7 está ausente o es un péptido que se selecciona del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ [Fórmula I]

en la que

X_1 es Aib;

X_2 es T o L;

X_3 es Aib;

X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-}CO\text{-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$, en el que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;

X_5 es E o A;

X_6 es T o E;

X_7 está ausente o es un péptido que se selecciona del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ [Fórmula I]

en la que

X_1 es Aib;

X_2 es T o L;

X_3 es Aib;

X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-}CO\text{-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$, en el que a es 1 o 2 y b es 14 a 24; X_5 es E o A;

X_6 es T o E;

X_7 está ausente o es un péptido que se selecciona del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;

y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

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

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_5 es E. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_5 es A.

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_6 es T. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_6 es E.

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_7 es GPSSGAPPPS. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_7 es GPSSG. En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de una cualquiera de las realizaciones anteriores en el que X_7 está ausente.

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

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 2; b es 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSGAPPPS; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 2; b es 18; X_5 es E; X_6 es T; X_7 es GPSSGAPPPS; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es L; a es 2; b es 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSGAPPPS; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 8).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 2; b es 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSG; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 9).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 2; b es 18; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSG; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO:10).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 1; b es 16; X_5 es A; X_6 es E; y X_7 está ausente (SEQ ID NO: 11).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 1; b es 18; X_5 es A; X_6 es E; y X_7 está ausente (SEQ ID NO: 12).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: a es 2; X_5 es E; X_6 es T; X_7 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado (SEQ ID NO: 16).

En ciertas realizaciones, el agonista del receptor de glucagón tiene la estructura de Fórmula I en la que: X_2 es T; a es 1; X_5 es A; X_6 es E; y X_7 está ausente (SEQ ID NO: 17).

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

Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención para su uso en combinación con una cantidad eficaz de uno o más agentes terapéuticos adicionales en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en DMT2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna. En ciertas realizaciones, la enfermedad es DMT2. En ciertas realizaciones, la enfermedad es la obesidad. En ciertas realizaciones, la

enfermedad es enfermedad del hígado graso. En ciertas realizaciones, uno o más agentes terapéuticos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en agonistas de GLP-1R, coagonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 ("DPP -4 ") e inhibidores del cotransportador 2 de glucosa sódica ("SGLT2"). En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista de GLP-1R. En ciertas realizaciones, el agonista de GLP-1R es dulaglutida. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un coagonista de GIP-GLP-1. En ciertas realizaciones, el coagonista de GIP-GLP-1 tiene la estructura de la SEQ ID NO: 15. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional es un agonista del receptor de insulina.

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

Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención para su uso en terapia. Otra realización de la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención para su uso en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en DMT2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna. En ciertas realizaciones, la enfermedad es DMT2. En ciertas realizaciones, la enfermedad es la obesidad. En ciertas realizaciones, la enfermedad es enfermedad del hígado graso.

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

Otra realización de la presente invención proporciona usar un agonista del receptor de glucagón de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de DMT2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia e hipoglucemia nocturna.

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

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

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

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

Las actividades de los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención también son selectivas para el receptor de glucagón en relación con el receptor GLP-1. Cuando se usan en la presente memoria, los términos "selectivo ... en relación con", "selectividad" y "selectivo contra" se refieren a un compuesto que muestra una potencia 50, 100, 200, 250, 500 o 1.000 veces mayor para el receptor de glucagón sobre el receptor GLP-1. Dicha selectividad se puede medir usando procedimientos conocidos *in vitro*, como los que se describen en los estudios a continuación.

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

Los perfiles de acción temporal extendido de los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención se logran mediante el uso de un resto de ácido graso conjugado con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral del aminoácido lisina en la posición 20. El ácido graso se conjuga con el grupo épsilon-amino de una cadena lateral de lisina a través de un conector, que comprende [2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$, en el que a es 1 o 2. El ácido graso y el ácido gamma-glutámico en el conector actúan como aglutinantes de albúmina y proporcionan el potencial para generar compuestos de acción prolongada. El ácido graso conjugado con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral del aminoácido lisina en la posición 20 por medio del conector comprende -CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que b es de 14 a 24. Por lo tanto, la estructura de conector del ácido graso completo comprende ([2- (2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 1 o 2 y b es 14 a 24. Como se muestra en las estructuras químicas de los Ejemplos 1-7 a continuación, la primera unidad de [2- (2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo se une al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina. La segunda unidad de [2-(2-Amino-etoxi) -etoxi]-acetilo se une al grupo amino de la primera unidad de [2-(2-Aminoetoxi)-etoxi]-acetilo. Luego, la primera unidad de γGlu se une al grupo amino de la segunda unidad de [2(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetilo a través del grupo γ-carboxilo de la cadena lateral. Cuando a = 2, la segunda unidad de γGlu se une al grupo α-amino de la primera unidad de γGlu a través del grupo γ-carboxilo de la cadena lateral. Finalmente, el ácido graso se une al grupo α-amino de la primera unidad (cuando a = 1) o segunda (cuando a = 2) de γGlu.

Los agonistas del receptor de glucagón de la invención se formulan preferentemente como composiciones farmacéuticas que se administran por rutas parenterales (*por ejemplo*, subcutáneo, intravenoso, intraperitoneal, intramuscular o transdérmico). Tales composiciones farmacéuticas y los procedimientos para preparar las mismas se conocen bien en la técnica. (*Véase, por ejemplo,* Remington: The Science and Practice of Pharmacy (D.B. Troy, Editor, 21st Edition, Lippincott, Williams & Wilkins, 2006). La ruta de administración preferida es la subcutánea.

Los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención pueden reaccionar con cualquiera de una serie de ácidos inorgánicos y orgánicos para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y la metodología común para prepararlas son bien conocidas en la técnica. (*Véase, por ejemplo*, P. Stahl y otros. Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, 2nd Revised Edition (Wiley-VCH, 2011)). Las sales farmacéuticamente aceptables de la presente invención incluyen sales de trifluoroacetato, hidrocloruro y acetato.

Un beneficio particular proporcionado por la selectividad de los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención para el receptor de glucagón sobre el receptor GLP-1 es la capacidad de proporcionar opciones de tratamiento flexibles cuando los agonistas del receptor de glucagón de la presente invención se administran en combinación con agentes terapéuticos adicionales, de modo que la relación de actividad en el receptor de glucagón a la actividad en el otro receptor (por ejemplo, GLP-1, GIP y/o receptor de insulina). Por lo tanto, en ciertas realizaciones preferidas, la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación con un agente terapéutico adicional en el tratamiento de DMT2. En ciertas realizaciones, el agente terapéutico adicional se selecciona del grupo que consiste en un agonista de GLP-1R, un coagonista de GIP-GLP-1 o un agonista del receptor de insulina.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "agente (s) terapéutico (s) adicional (es)" significa otro (s) compuesto (s) que se sabe que tienen efectos terapéuticos beneficiosos, tales como tratamientos para DMT2 y/u obesidad, que están actualmente disponibles y/o en desarrollo, que incluye por ejemplo agonistas de GLP-1R, coagonistas de GIP-GLP-1, agonistas de receptores de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de DPP-4 e inhibidores de SGLT2.

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

Cuando se usa en la presente memoria, el término "agonista de GLP-1R" se refiere a un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos de GLP-1 humano nativo (SEQ ID NO: 2), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o una proteína de fusión GLP-1, que mantiene la actividad en el receptor GLP-1. La actividad del receptor GLP-1 se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen usar experimentos *in vivo* y ensayos *in*

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

Cuando se usa en la presente memoria, el término "coagonista de GIP-GLP-1" se refiere a un compuesto que tiene actividad tanto en los receptores de GIP como de GLP-1. La actividad del receptor GIP y del receptor GLP-1 se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden el receptor GIP y/o la actividad de unión al receptor GLP-1 o la activación del receptor. Aunque actualmente no hay coagonistas de GIP-GLP-1 disponibles como tratamientos de DMT2, se ha descrito que múltiples análogos de GIP exhiben actividad del receptor GIP y GLP-1, *véase, por ejemplo*, WO2013164483; WO 2011119657.

En ciertas realizaciones preferidas en las que un agonista del receptor de glucagón de la presente invención se administra en combinación con un coagonista GIP-GLP-1, el coagonista GIP-GLP-1 tiene la siguiente estructura:

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQX_3AX_4VQWLIAGGPSSGAPPPS$;

en la que

X_1 es Aib;

X_2 es Aib;

X_3 es K, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2$- $(\gamma Glu)_a$-CO $(CH_2)_b$-CO_2H en el que a es 1 o 2 y b es 10 a 20;

X_4 es Phe o 1-naftilalanina (1-Nal);

y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado (SEQ ID NO: 13),

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En ciertas realizaciones preferidas a es 2, b es 18; X_4 es 1-Nal; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal. (SEQ ID NO: 14). En ciertas realizaciones preferidas a es 1, b es 18; X_4 es Phe y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal. (SEQ ID NO: 15). Tales coagonistas de GIP-GLP-1 se pueden preparar usando técnicas tales como las que se pueden usar para preparar agonistas de receptores de glucagón de la presente invención, como se describe a continuación en los ejemplos de Síntesis de Péptidos.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "agonista del receptor de insulina" se refiere a insulina humana, o análogos o derivados de la misma, o cualquier otra proteína que sea capaz de unirse y activar el receptor de insulina. La actividad del receptor de insulina se puede medir mediante procedimientos conocidos en la técnica, que incluye el uso de experimentos *in vivo* y ensayos *in vitro* que miden la actividad de unión al receptor de insulina o la activación del receptor. Un análogo de insulina es una molécula que tiene una modificación que incluye una o más sustituciones, deleciones, inversiones o adiciones de aminoácidos en comparación con la insulina humana nativa, cuya estructura es bien conocida. Un derivado de insulina es una molécula que tiene la secuencia de aminoácidos de la insulina humana nativa, o un análogo de la misma, pero que además tiene al menos una modificación química de uno o más de sus grupos laterales de aminoácidos, átomos de α-carbono, grupo amino terminal o grupo terminal de ácido carboxílico. Una proteína de fusión de insulina es una proteína heteróloga que comprende insulina, un análogo de insulina o una porción derivada de insulina y un segundo polipéptido. Aunque se puede considerar cualquier agonista del receptor de insulina para su uso en realizaciones en las que un agonista del receptor de glucagón de la presente invención se administra en combinación con un agonista del receptor de insulina, los agonistas del receptor de insulina preferidos son aquellos que tienen una duración de acción basal o prolongada. Los agonistas de los receptores de insulina disponibles actualmente con actividad basal incluyen insulina glargina, insulina detemir e insulina degludec, cada una de las cuales se indica para la administración una vez al día.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la DMT2.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la obesidad.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de la enfermedad del hígado graso.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en el tratamiento de NASH.

En otras realizaciones, la presente invención también proporciona un agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, para su uso en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales, tales como agonistas de GLP-1R, coagonistas de GIP-GLP-1, agonistas del receptor de insulina, oxintomodulinas, metformina, tiazolidinedionas, sulfonilureas, inhibidores de DPP-4 e inhibidores de SGLT2 en el tratamiento de la DMT2.

Cuando se usa en la presente memoria, el término "paciente que lo necesita" se refiere a un mamífero, preferentemente un ser humano o un bovino, con una enfermedad o afección que requiere tratamiento, que incluye, por ejemplo, DMT2, obesidad, enfermedad del hígado graso, EHNA y/o síndrome metabólico.

Como se usa en la presente memoria, el término "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad o dosis del agonista del receptor de glucagón de la presente invención, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo que, después de la administración de una dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente bajo diagnóstico o tratamiento. Una cantidad eficaz se puede determinar fácilmente por una persona con experiencia en la técnica mediante el uso de técnicas conocidas y mediante la observación de los resultados que se obtienen en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad eficaz para un paciente, se consideran una serie de factores, que incluyen, pero no están limitados a: la especie de mamífero; su tamaño, edad y salud general; la enfermedad específica o trastorno involucrado; el grado o implicación o la gravedad de la enfermedad o trastorno; la respuesta del paciente individual; el agonista del receptor de glucagón particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad de la preparación administrada, el régimen de dosis seleccionado, el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias pertinentes.

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

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

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

La invención se ilustra, además, mediante los siguientes ejemplos, los cuales no se deben construir como limitantes.

Síntesis de péptidos

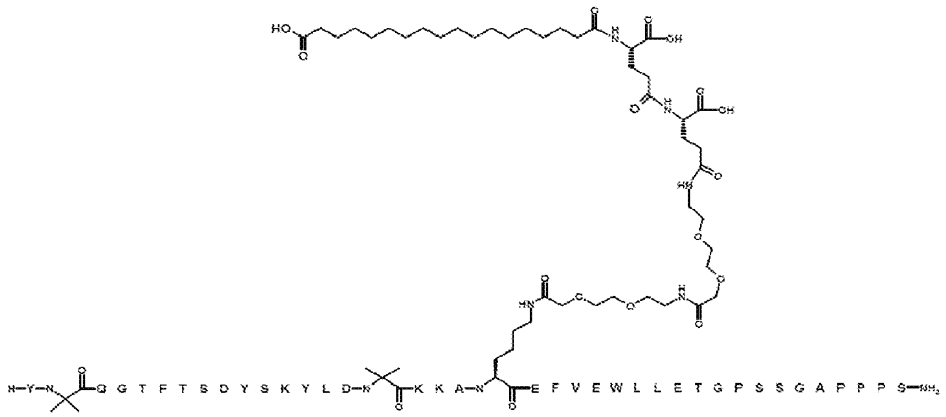
Ejemplo 1

El ejemplo 1 es un agonista del receptor de glucagón que se representa mediante la siguiente descripción:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-CO-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$ en el que a es 2 y b es 16; X_5 es E; X_6 es T; X_7 es GPSSGAPPPS; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 6).

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



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

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

Después de terminar el alargamiento de la resina peptídica que se describió anteriormente, el grupo protector Alloc presente en Lys20 se elimina utilizando cantidades catalíticas de $Pd(PPh_3)_4$ en presencia de $PhSiH_3$ como neutralizador. Ciclos adicionales de acoplamiento/desprotección que utilizan una estrategia Fmoc/t-Bu para extender la cadena lateral Lys20 implican Fmoc-NH-PEG_2-CH_2COOH (Catálogo ChemPep#280102), Fmoc-Glu(OH)-OtBu (Catálogo ChemPep#100703) y HOOC- $(CH_2)_{16}$-COOtBu. En todos los acoplamientos, se utilizan 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4 horas a 25 °C.

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

En una síntesis realizada esencialmente como se describe anteriormente, la pureza del Ejemplo 1 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3$ = 1.713,6; calculado $M+3H^+/3$ = 1.714,3; observado: $M+4H^+/4$ = 1.285,7; calculado $M+4H^+/4$ = 1.285,9).

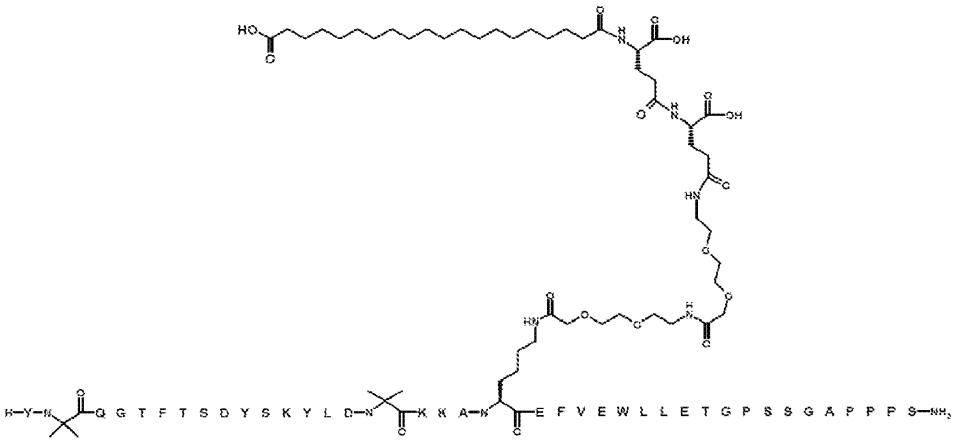
Ejemplo 2

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que: X_1 es Aib, X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2$-$(\gamma Glu)_a$-CO-$(CH_2)_b$-$CO_2H$; a es 2; b es 18; X_5 es E; X_6 es T; X_7 es GPSSGAPPPS; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 7).

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



El péptido según el Ejemplo 2 se sintetiza de manera similar a la que se describió anteriormente en el Ejemplo 1. HOOC-$(CH_2)_{18}$-COOtBu se incorpora utilizando 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4h a 25 °C.

En una síntesis que se realiza esencialmente como se describe anteriormente para el Ejemplo 1, se examina la pureza del Ejemplo 2 mediante HPLC analítica de fase inversa, y se confirma la identidad usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3$ = 1.723,2; calculado $M+3H^+/3$ = 1.723,6; observado: $M+4H^+/4$ = 1.292,9; calculado $M+4H^+/4$ = 1.293,0).

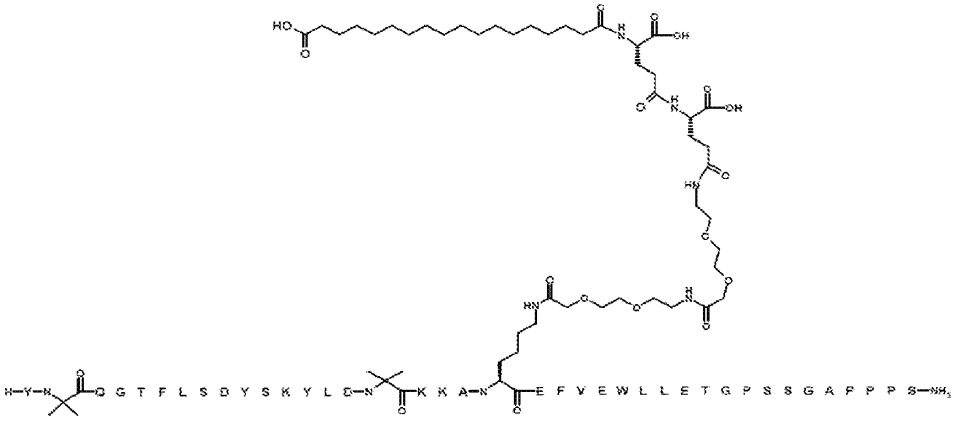
Ejemplo 3

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5$ $WLLEX_6X_7$

en el que: X_1 es Aib; X_2 es L; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_a$-CO- $(CH_2)_b$-CO_2H; a es 2; b es 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSGAPPPS; y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C terminal (SEQ ID NO: 8).

A continuación, se muestra una descripción de la estructura del Ejemplo 3 que usa los códigos de aminoácidos estándar de una letra con la excepción de los residuos Aib2, Aib 16 y K20, donde las estructuras de estos residuos de aminoácidos se han expandido:



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

En una síntesis que se realiza esencialmente como se describe anteriormente para el Ejemplo 1, se examina la pureza del Ejemplo 3 mediante HPLC analítica de fase inversa, y se confirma la identidad usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3$ = 1.717,4; calculado $M+3H^+/3$ = 1.718,3; observado: $M+4H^+/4$ = 1.288,3; calculado $M+4H^+/4$ = 1.289,0).

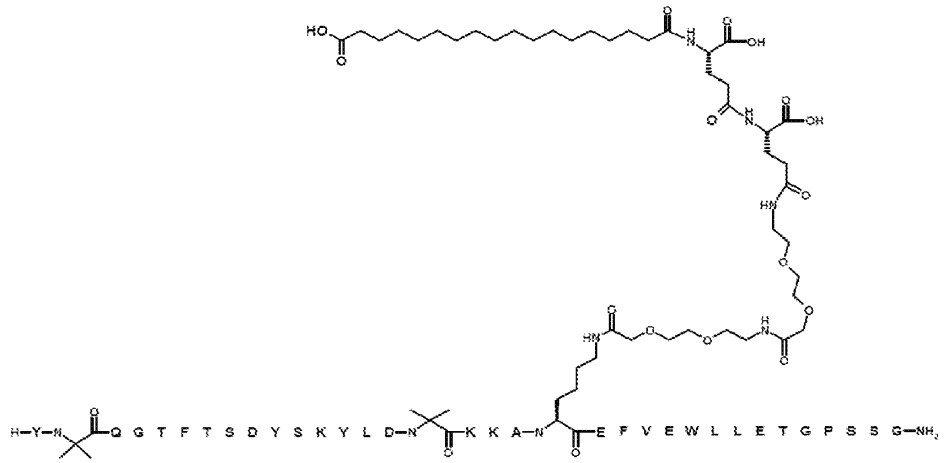
Ejemplo 4

El ejemplo 4 es un agonista del receptor de glucagón representado por la siguiente descripción:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_a$-CO- $(CH_2)_b$-CO_2H; a es 2; b es 16; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 9).

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



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

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

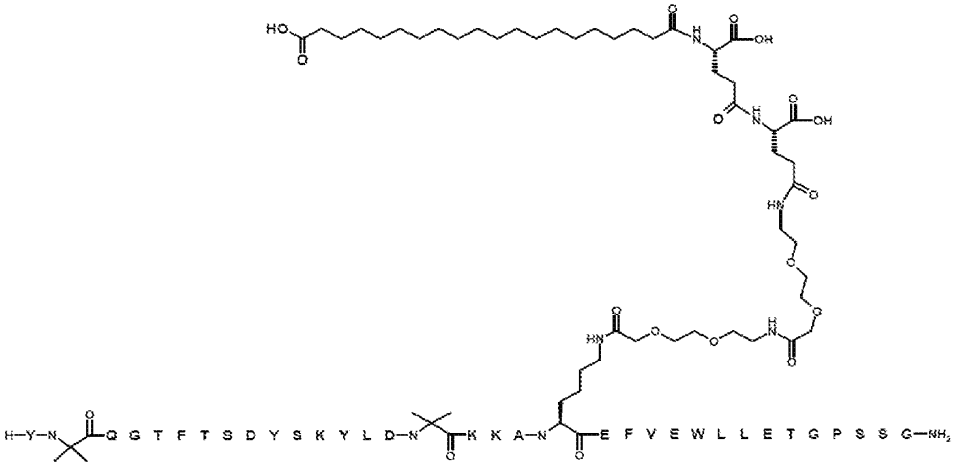
Ejemplo 5

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_a$-CO- $(CH_2)_b$-CO_2H; a es 2; b es 18; X_5 es E; X_6 es T; y X_7 es GPSSG; y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 10).

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



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

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

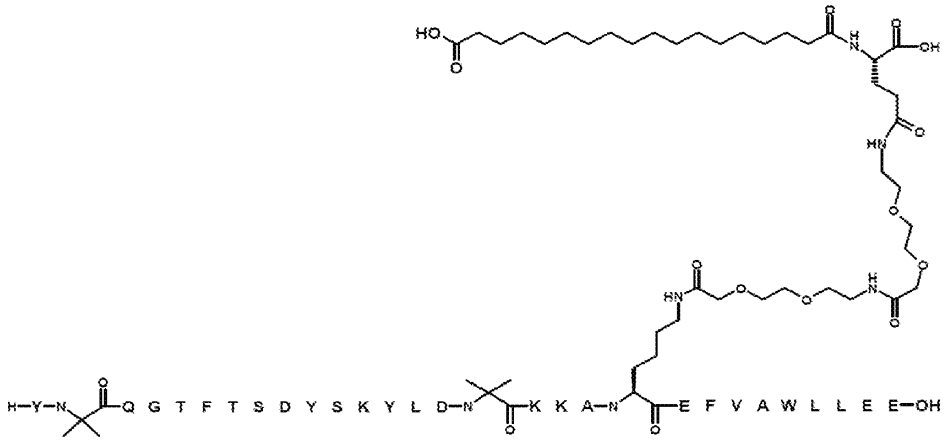
Ejemplo 6

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)_2-(\gamma Glu)_a-CO-(CH_2)_b-CO_2H$; a es 1; b es 16; X_5 es A; X_6 es E; y X_7 está ausente; y el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal (SEQ ID NO: 11).

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



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

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

Después de terminar el alargamiento de la resina peptídica que se describió anteriormente, el grupo protector Alloc presente en Lys20 se elimina utilizando cantidades catalíticas de $Pd(PPh_3)_4$ en presencia de $PhSiH_3$ como neutralizador. Ciclos adicionales de acoplamiento/desprotección que utilizan una estrategia Fmoc/t-Bu para extender la cadena lateral Lys20 involucró Fmoc-NH-PEG_2-CH_2-COOH (Catálogo ChemPep#280102), Fmoc-Glu (OH)-OtBu (Catálogo ChemPep#100703) y HOOC-$(CH_2)_{16}$-COOtBu. En todos los acoplamientos, se utilizan 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4 horas a 25 °C.

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

En una síntesis realizada esencialmente como se describe anteriormente, la pureza del Ejemplo 6 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y la identidad se confirma usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3$ = 1.382,7; calculado $M+3H^+/3$ = 1.383,3; observado: $M+4H^+/4$ = 1.036,6; calculado $M+4H^+/4$ = 1.037,7).

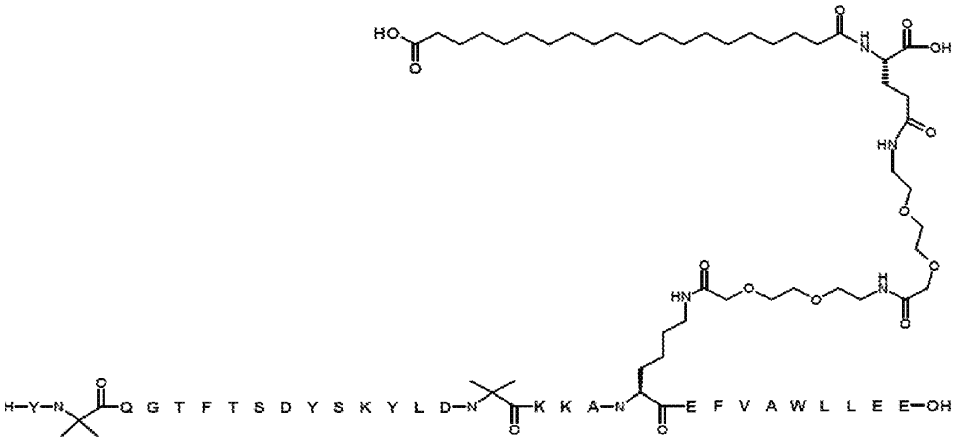
Ejemplo 7

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

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX6X_7$

en el que X_1 es Aib; X_2 es T; X_3 es Aib; X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-}CO\text{-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$; a es 1; b es 18; X_5 es A; X_6 es E; y X_7 está ausente; y el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal (SEQ ID NO: 12).

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



El péptido según el Ejemplo 7 se sintetiza de manera similar a la que se describió anteriormente en el Ejemplo 6. $HOOC\text{-}(CH_2)_{18}\text{-}COOtBu$ se incorpora utilizando 3 equivalentes del bloque de construcción con PyBOP (3 equiv) y DIEA (6 equiv) en DMF durante 4h a 25 °C.

En una síntesis que se realiza esencialmente como se describe anteriormente en el Ejemplo 6, la pureza del Ejemplo 7 se examina mediante HPLC analítica de fase inversa, y se confirma la identidad usando LC/MS (observado: $M+3H^+/3$ = 1.391,8; calculado $M+3H^+/3$ = 1.392,6; observado: $M+4H^+/4$ = 1.044,3; calculado $M+4H^+/4$ = 1.044,7).

Función in vitro

Afinidad de unión

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

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

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

El ensayo de unión al receptor Gcg de rata utiliza el receptor de glucagón de rata clonado (rGcg-R) (Svoboda, M, Ciccarelli, E, Tastenoy, M, Robberecht, P, Christophe, J. A cDNA construct allowing the expression of rat hepatic glucagon receptors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 192 (1), 135-142 (1993), GenBank: L04796) en membranas aisladas de células 293HEK que expresan transitoriamente rGcg-R. El ADNc de rGcg-R se subclona en el plásmido de expresión pcDNA3.1 (Promega)-ZeoR. Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y se expresa transitoriamente durante 48 horas.

Las membranas plasmáticas brutas se preparan usando células de cultivo adherente. Las células se lisan en hielo en tampón hipotónico que contiene Tris HCl 50 mM, pH 7,5 e inhibidores de proteasa Roche Complete™ con EDTA. La suspensión celular se rompe con un homogenizador Potter-Elvehjem de vidrio equipado con una mano de teflón® para 25 golpes. El homogenado se centrifugó a 4 °C a 1.100 x g por 10 minutos. El sobrenadante se recoge y almacena en hielo mientras el sedimento se resuspende en tampón hipotónico y se vuelve a homogenizar. La mezcla se centrifuga a 1.100 x g durante 10 minutos. El segundo sobrenadante se combina con el primer sobrenadante y se centrifuga a 35.000 x g durante 1 hora a 4 °C. El sedimento de membrana se resuspende en tampón de homogenización que contiene inhibidores de proteasa, se congela rápidamente en nitrógeno líquido y se almacena como alícuotas en un congelador a -80 °C hasta su uso.

Gcg se radioyoda por procedimiento de I-125-lactoperoxidasa y se purifica por HPLC de fase inversa en Perkin-Elmer (NEX207). La actividad específica es 2.200 Ci/mmol. La determinación K_D se realiza mediante competencia homóloga o análisis de unión de saturación. La K_D para Gcg-R humano se estima en 3,92 nM y se usa para calcular los valores de Ki para todos los compuestos que se prueban en el ensayo de hGcg-R. La K_D para Gcg-R de ratón se estima en 3,52 nM y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos que se prueban en el ensayo mGcg-R. La K_D para Gcg-R de rata se estima en 21,4 nM y se usa para calcular los valores de K_i para todos los compuestos que se prueban en el ensayo rGcg-R.

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

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

Tabla 1.

	hGcg-R Ki, nM ± SEM, (n)	mGcg-R Ki, nM ± SEM, (n)	rGcg-R Ki, nM ± SEM, (n)
Ejemplo 1	2,04 ± 1,02 (n=2)	1,92 ± 0,71 (n=2)	9,78 ± 0,22 (n=2)
Ejemplo 2	1,07 ± 0,16 (n=2)	0,991 ± 0,066 (n=2)	5,59 ± 0,24 (n=2)
Ejemplo 3	0,287 ± 0,171 (n = 2)	0,174 (n=1)	1,56 ± 0,13 (n=2)
Ejemplo 4	0,738 (n=1)	0,774 (n=1)	5,86 (n=1)
Ejemplo 5	1,59 (n=1)	1,58 (n=1)	4,36 (n=1)
Ejemplo 6	0,316 (n=1)	0,123 (n=1)	0,98 (n=1)
Ejemplo 7	0,673 (n=1)	0,753 (n=1)	1,38 (n=1)
Glucagón humano	3,64 ± 0,91 (n=3)	2,41 ± 0,22 (n=3)	23,3 ± 1,7 (n=3)

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

Actividad funcional y selectividad

La actividad funcional y la selectividad se determinan mediante la cuantificación de AMPc intracelular en células HEK293 que expresan el receptor de glucagón humano (hGcg-R), el receptor del péptido-1 similar al glucagón humano (hGLP-1R) o el péptido inhibidor gástrico humano (también conocido como receptor polipeptídico

insulinotrópico dependiente de glucosa, hGIP-R). Los protocolos y resultados experimentales se describen a continuación.

El ensayo de AMPc funcional de hGcg-R utiliza células 293HEK que expresan hGcg-R clonado (Lok, S y otros, Gene 140 (2), 203-209 (1994)). El ADNc de hGcg-R se subclona en el plásmido de expresión phD (expresión transactivada de la proteína C humana recombinante carboxilada gamma completa, un factor antitrombótico. Grinnell, BW, y otros, Bio/Technology 5: 1189-1192 (1987)). Este ADN plasmídico se transfecta en células 293HEK y las células se seleccionan con 200 µg/mL de higromicina.

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

El ensayo funcional hGIP-R utiliza hGIP-R (Usdin, TB, Gruber, C., Modi, W. y Bonner, TI, GenBank: AAA84418.1) clonado en el plásmido pcDNA3.1 (Promega)-NeoR. El plásmido hGIP-R-pcDNA3.1/Neo se transfecta en células de ovario de hámster chino, CHO-S, para cultivos en suspensión y se selecciona en presencia de 500 µg/mL de geneticina (Invitrogen).

Cada línea celular que sobreexpresa el receptor se trata con péptido en DMEM (medio Eagle modificado de Dulbecco, Gibco Cat#31053) suplementado con IX GlutaMAX™ (dipéptido L-alanil-L-glutamina en NaCl al 0,85 %, Gibco Cat#35050), 0,1 % de caseína (Sigma Cat#C4765), 250 µM IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) y 20 mM de HEPES [N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'- (ácido 2- etanosulfónico), HyClone Cat#SH30237.01] en un volumen de ensayo de 40 µL. Después de una incubación de 60 minutos a temperatura ambiente, el aumento resultante en AMPc intracelular (adenosina 3', 5' monofosfato cíclico) se determina cuantitativamente usando el kit de ensayo CisBio cAMP Dynamic 2 HTRF (CisBio 62AM4PEC). Los niveles de AMPc dentro de la célula se detectan agregando el conjugado cAMP-d2 en el tampón de lisis celular (20 µL) seguido del anticuerpo anti-cAMP-Eu^{3+}-Cryptate, también en tampón de lisis celular (20 µL). El ensayo competitivo resultante se incuba durante al menos 60 minutos a temperatura ambiente, seguido de detección utilizando un instrumento PerkinElmer Envision® con excitación a 320 nm y emisión a 665 nm y 620 nm. Las unidades de Envision (emisión a 665nm/620nm*10,000) son inversamente proporcionales a la cantidad de AMPc presente y se convierten en nM de AMPc por pocillo utilizando una curva estándar de AMPc. La cantidad de AMPc generada (nM) en cada pocillo se convierte en un porcentaje de la respuesta máxima observada con 10 nM de GLP-1 humano (7-36) NH_2 (para el ensayo de hGLP-1R), 10 nM de Gcg humano (para el ensayo hGcg-R) o 10 nM de GIP humano (1-42) NH_2 (para el ensayo de hGIP-R). Un valor de CE_{50} relativo y porciento superior (E_{max}) se obtienen mediante análisis de regresión no lineal utilizando el porcentaje de respuesta máxima frente a la concentración de péptido agregado, ajustada a una ecuación logística de cuatro parámetros.

Los datos funcionales para los Ejemplos 1-7, GIP humano (1-42) NH_2, GLP-1 humano (7-36) NH_2 y Gcg humano se muestran en la Tabla 2 a continuación. Las medias para la CE_{50} se expresan como medias geométricas ± error estándar de la media (SEM) con el número de repeticiones (n) indicado entre paréntesis. Un calificador (>) indica que el % de eficacia no alcanzó el 50 % y el CE_{50} calculado se obtiene utilizando la concentración más alta probada.

Tabla 2.

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

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

Farmacocinéticas

Farmacocinéticas en ratas

A las ratas macho Sprague Dawley se les administra una dosis subcutánea única (100 nmoles/kg) de un compuesto ejemplo en tampón Tris (pH 8,0) a un volumen de 1 mL/kg. Se recoge sangre de cada animal a las 1, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 y 240 horas después de la dosis.

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

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

Los parámetros farmacocinéticos medios después de una sola dosis subcutánea de 100 nmol/kg a ratas Sprague Dawley macho se proporcionan en la Tabla 3 a continuación (n = 3 para los Ejemplos 1, 2 y 5 y Tmáx y Cmáx para los Ejemplos 3 y 4; n = 2 para $T_{1/2}$, $AU_{C0\text{-}inf}$ y CL/F para los Ejemplos 3 y 4).

Tabla 3.

Compuesto	$T_{1/2}$(h)	Tmáx (h)	Cmáx (nmol/L)	$AUC_{0\text{-}inf}$ (h*nmol/L)	CL/F (mL/h/kg)
Ejemplo 1	13	8	425	11.692	8,8
Ejemplo 2	22	24	346	21.329	4,7
Ejemplo 3	11	8	394	11.133	9,2
Ejemplo 4	16	6	257	5.948	17,0
Ejemplo 5	22	24	237	12.948	7,8
Abreviaturas: $AUC_{0\text{-}inf}$= área bajo la curva de 0 a infinito, CL/F = aclaramiento/biodisponibilidad, Tmáx = tiempo hasta la concentración máxima, Cmáx = concentración plasmática máxima, T1/2 = vida media, ND = sin datos.					

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

Farmacocinéticas en monos cynomolgus

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

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

Tabla 4.

Compuesto (ruta/dosis)	ID del animal	$T_{1/2}$(h)	Tmáx (h)	C_0 o Cmáx (nmol/L)	$AUC_{0\text{-inf}}$ (h*nmol/L)	CL o CL/F (mL/h/kg)
Ejemplo 1 (IV 50 nmoles/kg)	Media	42	NA	1.182	37.278	1,36
Ejemplo 1 (SC 50 nmoles/kg)	Media	44	9	425	31.821	1,57
Ejemplo 2 (SC 50 nmoles/k)	Media	79	18	377	46.292	1,08
Abreviaturas: $AUC_{0\text{-inf}}$ = área bajo la curva de 0 a infinito, CL = aclaramiento, CL/F = aclaramiento/biodisponibilidad, Tmáx = tiempo hasta la concentración máxima, C_0 = concentración extrapolada a tiempo 0 hora, Cmáx = concentración plasmática máxima, T1/2 = vida media, NA = no aplicable.						

Estos datos muestran que los ejemplos 1 y 2 tienen una duración de acción prolongada en relación con el glucagón humano nativo, que tiene una $T_{1/2}$ de menos de una hora.

Estudios in vivo

Monitoreo continuo de glucosa en ratas

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

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

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

Características fisicoquímicas

Solubilidad y Estabilidad

Las muestras de los Ejemplos 1-6 se preparan a 5 mg/mL en H_2O y se dializan como se describe en tampones C6N (10 mM de citrato, 100 mM de NaCl, pH 6), C7N (10 mMde citrato, 100 mM de NaCl, pH 7), H6.5N (10 mM de histidina, 100 mM de NaCl, pH 6,5) y H7.5N (10 mM de histidina, 100 mM de NaCl, pH 7,5). Las muestras se concentran a 10 mg/mL del péptido como se describe y se mantienen a 4 °C durante una semana. Las muestras se evalúan visualmente y mediante SEC-HPLC como se describe.

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

Tabla 5.

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

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

Todas las formulaciones permanecen transparentes e incoloras. Los datos de SEC-HPLC y RP-HPLC se encuentran en la Tabla 6. El crecimiento del polímero HMW no excede el 0,2 % para ninguna formulación. La recuperación máxima por RP-HPLC está dentro del 5 % para todas las formulaciones.

Tabla 6.

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

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

Estabilidad química

La estabilidad química para el Ejemplo 1 se determina en diferentes tampones de varios valores de pH. Las muestras se preparan en H_2O a una concentración de 5 mg/mL, se dializan usando casetes de diálisis Slide-A-Lyzer, 2000 MWCO (número de parte 66203) durante la noche a 4 °C en el tampón de interés, se filtran a través de un filtro de 0,22 µm (Millex, SLGV013SL) luego se diluyen a 1 mg/mL en el tampón respectivo. Las composiciones del tampón son Tris-HCl a 10 mM en H_2O pH 8 (T8), Tris-HCl a 10 mM en H_2O pH 7 (T7), histidina a 10 mM en H_2O pH 7 (H7), o citrato a 10 mM en H_2O pH 6 (C6). Cada muestra de 1 mg/mL se transfiere a tres viales. Las muestras se mantienen a 4 °C, 25 °C y 40 °C. Las muestras se evalúan cada dos semanas durante un total de cuatro semanas. Las muestras se evalúan visualmente para determinar la turbidez y la separación de fases. La estabilidad del compuesto se evalúa mediante HPLC analítica de fase inversa (RP-HPLC) en una columna Waters Symmetry Shield RP18, 3,5 µm, 4,6 X 100 mm (número de parte 18600179) que se calienta a 60 °C con un AB (A=0,1 % TFA/H_2O, B=0,085 % TFA/acetonitrilo) gradiente de 10 % de B isocrático durante 3 min, 30 % de B durante 3 min, 30-60 %) B durante 30 min, y 95 % de B durante 2 min a una velocidad de flujo de 0,9 mL/min (longitud de onda de 214 nm). La estabilidad también se evalúa mediante HPLC de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) en una columna Insulin HMWP, 7,8 X 300 mm (número de parte WAT2015549) con un tampón de fosfato de sodio 20 mM, acetonitrilo al 20 %, pH 7,2 a un caudal de 0,5 mL/min durante 40 min.

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

Tabla 7.

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

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

Estabilidad física.

Las muestras de prueba del Ejemplo 1 se preparan mediante diálisis en tampón T7 y luego se formulan a 2 mg/mL del péptido en T7m, T7Nm y T7Tm como se describe. Cada formulación se transfiere a viales de vidrio limpios y se agita a 400 rpm a través de un escape magnético recubierto de teflón a temperatura ambiente durante 6 horas. Se toman alícuotas de 100 µL para evaluación a tiempo 0, 1 hora, 3 horas y 6 horas. Las muestras se evalúan visualmente y mediante SEC-HPLC como anteriormente.

Todas las formulaciones permanecen transparentes e incoloras sin opalescencia ni precipitación. Como se muestra en la Tabla 8, los porcientos del péptidos en el pico principal de SEC-HPLC permanecen dentro del 5 % para todas las formulaciones. Los datos indican que el Ejemplo 1 tiene buenas características de estabilidad física en las condiciones que se probaron.

Tabla 8.

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

<u>Estudios combinados</u>

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

Co-formulaciones de los Ejemplos 1 y 3 con un coagonista GIP-GLP-1 de la SEQ ID NO: 15 o dulaglutida se preparan como se describe a continuación en los estudios de estabilidad, y las actividades de compuestos individuales y co-formulaciones se miden usando los procedimientos que se describieron anteriormente. Los datos se muestran en las Tabla 9 y 10. Un calificador (>) indica que el % de eficacia no alcanzó el 50 % y la CE_{50} que se calculó se obtiene utilizando la concentración más alta probada.

Tabla 9.

		CE_{50} (promedio de N = 2 ± desviación estándar, *N = 1)		
Tratamiento	Condiciones de la muestra	Ensayo del receptor Gcg	Ensayo del receptor GLP-1	Ensayo del receptor GIP
Ejemplo 3	T7-4C-4wk	14,3 ± 3,4 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	24,9 ± 2,9 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	21,1 ± 4,0 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	21,1 ± 5,1 pM	> 100 nM	> 100 nM
Ejemplo 3 + coagonista de GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	21,3 ± 2,5 pM	1,47 nM*	0,65 nM*
	T7-40C-4wk	21,9 ± 0,4 pM	2,66 nM*	0,74 nM*
	T7m-4C-4wk	16,0 ± 3,4 pM	3,08 nM*	0,71 nM*
	T7m-40C-4wk	24,2 ± 0,5 pM	2,61 nM*	0,40 nM*
Ejemplo 1	T7-4C-4wk	20,3 ± 2,5 pM	> 100 nM	> 100 nM
	T7-40C-4wk	21,7 ± 3,4 pM	57,53 nM*	> 100 nM
	T7m-4C-4wk	23,0 ± 0,3 pM	43,83 nM*	> 100 nM
	T7m-40C-4wk	19,4 ± 5,0 pM	49,66 nM*	> 100 nM
Ejemplo 1 + coagonista de GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	23,7 ± 0,7 pM	1,78 nM*	0,49 ± 0,16 nM
	T7-40C-4wk	19,2 ± 2,4 pM	1,65 nM*	0,60 ± 0,21 nM
	T7m-4C-4wk	16,5 ± 1,8 pM	1,41 nM*	0,39 ± 0,06 nM
	T7m-40C-4wk	18,7 ± 0,6 pM	1,21 nM*	0,36 ± 0,34 nM
Coagonista de GIP-GLP-1	T7-4C-4wk	> 100 nM	2,56 nM*	0,70 nM*
	T7-40C-4wk	> 100 nM	2,76 nM*	0,41 nM*
	T7m-4C-4wk	> 100 nM	1,61 nM*	0,30 ± 0,19 nM
	T7m-40C-4wk	> 100 nM	0,73 nM*	0,15 ± 0,02 nM

Tabla 10.

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

	C6.5MT-4C-4wk	54,0 ± 65,0 nM	0,40 ± 0,14 nM	> 100 nM
	C6.5MT-40C-4wk	> 100 nM	0,29 ±0,09 nM	> 100 nM

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

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

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

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

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

Se administran el vehículo, compuestos de prueba (rango de dosis de 3 a 10 nmoles/kg), el agonista de GLP-1R (10 nmoles/kg), el coagonista de GIP-GLP-1 (10 nmoles/kg) o combinaciones de los mismos (rango de dosis de 3 a 10 nmoles/kg) disueltos en el vehículo (20 mM de tampón Tris-HCl, pH 8,0) mediante inyección SC a *ad libitum* se alimentaron los ratones 30-90 minutos antes del inicio del ciclo de oscuridad cada tres días durante 15 días. Las inyecciones SC se realizan los días 1, 4, 7, 10 y 13. El peso corporal diario, la ingesta de alimentos y la glucosa se miden durante todo el estudio. Los cambios absolutos en el peso corporal se calculan restando el peso corporal del mismo animal antes de la primera inyección de la molécula. En los días 0 y 14, la masa grasa total se mide por resonancia magnética nuclear (RMN) usando un instrumento Echo Medical System (Houston, TX).

La glucosa en sangre diaria se mide con el glucómetro Accu-Chek (Roche) de sangre de la vena de la cola. Al final del estudio, los animales se sacrifican y los hígados se extraen y se congelan. Los triglicéridos hepáticos, determinados a partir de homogenizados de hígados que se recogieron en el sacrificio, y el colesterol en plasma se miden en un analizador clínico Hitachi Modular P. Las comparaciones estadísticas entre grupos se realizan mediante ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett. Los valores de ED_{50} para la pérdida de peso se determinan en el GraphPad Prism utilizando la herramienta de ajuste no lineal.

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

Las combinaciones de los Ejemplos 1 y 2 con agonista de GLP-1R o coagonista de GIP-GLP-1 tienen efectos sinérgicos sobre el peso corporal y la masa grasa en comparación con los efectos de los ejemplos 1 o 2, agonista de GLP-1R o coagonista de GIP-GLP-1 solo (tablas 11 y 12).

Tabla 11.

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

Tabla 12.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	% de cambio desde el peso corporal inicial	% de cambio desde la masa grasa inicial
Vehículo	0	1,14 ± 1,02	3,17 ± 1,61
Agonista de GLP1-R	10	-10,74 ± 1,42*	-21,52 ± 3,51*
Coagonista de GIP-GLP-1	10	-17,76 ± 4,52***	-33,30 ± 7,35****
Ejemplo 1	3	-1,77 ± 2,08	-2,08 ± 3,59
Ejemplo 1	10	-3,87 ± 1,41	-6,20 ± 2,90
Ejemplo 2	3	-0,85 ± 2,71	0,11 ± 5,11
Ejemplo 2	10	-5,29 ± 0,84	-6,03 ± 1,99
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 1	10+3	-17,49 ± 2,90***	-34,41 ± 7,38****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 1	10+10	-23,49 ± 1,40****	-48,16 ± 4,14****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 2	10+3	-14,83 ± 2,43**	-27,21 ± 6,34**
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 2	10+10	-30,60 ± 4,33****	-55,55 ± 7,93****
Agonista de GIP-GLP + Ejemplo 1	10+3	-18,41 ± 1,23****	-39,06 ± 4,13****
Agonista de GIP-GLP + Ejemplo 1	10+10	-32,01 ± 3,81****	-65,66 ± 5,92****
Agonista de GIP-GLP + Ejemplo 2	10+3	-15,94 ± 1,20***	-33,54 ± 3,43****
Agonista de GIP-GLP + Ejemplo 2	10+10	-40,37 ± 4,03****	-76,34 ± 3,11 ****
* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 y **** p<0,0001 significación del grupo de control del vehículo (ANOVA de una vía, de Dunnett).			

Los datos sobre los efectos sobre la glucosa en sangre, el colesterol plasmático y los triglicéridos hepáticos se proporcionan a continuación en las tablas 13 (media ± SEM, n=5) y 14 (media ± SEM, n=6). Mientras que los Ejemplos 1 y 2 administrados individualmente aumentan la glucosa en sangre de una manera dependiente de la

dosis, las combinaciones de tales agonistas del receptor de glucagón con agonistas GLP-1R o coagonistas GIP-GLP-1 reducen la glucosa en sangre, el colesterol en plasma y los triglicéridos hepáticos.

Tabla 13.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	AUC de glucosa en sangre (mg/dL/15 días)	Colesterol del Plasma (mg/dL)	Triglicéridos de hígado (mg/g de tejido)
Vehículo	0	2.224 ± 78,55	228,00 ± 6,50	200,29 ± 33,67
Ejemplo 1	3	2.553 ± 112,5*	207,00 ± 6,43	68,83 ±5,82****
Ejemplo 1	10	2.607 ± 109,4**	157,80 ± 15,44****	32,94 ± 11,23****
Agonista de GLP1-R	10	1.565 ± 26,39****	153,40 ± 11,64****	55,01 ± 12,62****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 1	10+3	1.452 ± 25,48****	96,20 ± 7,86****	20,89 ± 4,39****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 1	10+10	1.388 ± 80,92****	86,60 ± 3,47****	12,78 ± 1,57****
Coagonista de GIP-GLP-1	10	1.453 ±27,96****	137,80 ± 9,05****	32,60 ± 6,70****
Coagonista de GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10+3	1.256 ± 111,5****	103,00 ± 3,56****	35,47 ± 15,78****
Coagonista de GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10 + 10	1.044 ± 63,37****	77,40 ± 10,10****	24,99 ± 13,43****
* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 del grupo de control (ANOVA de una vía, de Dunnett).				

Tabla 14.

Tratamiento	Dosis (nmol/kg)	AUC de glucosa en sangre (mg/dL/15 días)	Colesterol del Plasma (mg/dL)	Triglicéridos de hígado (mg/g de tejido)
Vehículo	0	1806 ± 52,85	224,40 ± 5,12	174,72 ± 26,56
Agonista de GLP1-R	10	1.189 ± 28,83***	149,50 ± 12,02****	46,06 ± 12,31****
Coagonista de GIP-GLP-1	10	1.137 ± 63,27****	135,50 ± 7,11****	48,50 ± 7,18****
Ejemplo 1	3	2.080 ± 103,2	230,50 ± 6,61	111,87 ± 22,43**
Ejemplo 1	10	2.491 ± 110,9****	152,83 ± 8,82****	29,42 ± 3,54****
Ejemplo 2	3	2.433 ± 124,7***	201,83 ± 10,11	75,45 ± 12,82****
Ejemplo 2	10	2.641 ± 186,6****	117,67 ± 4,46****	16,33 ± 1,53****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 1	10 + 3	1.081 ± 56,68****	132,50 ± 19,56****	34,34 ± 6,48****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 1	10 + 10	1.031 ± 61,29****	83,33 ± 8,50****	25,57 ± 7,27****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 2	10 + 3	1.098 ± 52,69****	152,00 ± 9,32****	38,99 ± 5,96****
Agonista de GLP1-R + Ejemplo 2	10 + 10	1.008 ± 107,2****	78,50 ± 6,03****	34,42 ± 14,36****
Coagonista de GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10 + 3	1.142 ± 31,32****	131,83 ± 6,42****	22,48 ± 3,92****
Coagonista de GIP-GLP-1 + Ejemplo 1	10 + 10	916,9 ± 97,73****	91,67 ± 4,75****	6,99 ± 1,29****
Coagonista de GIP-GLP-1 + Ejemplo 2	10 + 3	1.063 ± 20,89****	119,33 ± 5,79****	22,87 ± 5,94****
Coagonista de	10 + 10	801,8 ± 48,21****	90,33 ± 7,89****	17,99 ± 9,65****

GIP-GLP-1 + Ejemplo 2				
* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001 del grupo de control (ANOVA de una vía, de Dunnett).				

Estabilidad en Co-Formulación con el coagonista de GIP-GLP-1

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

La recuperación total del pico para todas las muestras está dentro del 5 % mediante RP-HPLC. Todas las formulaciones permanecen transparentes e incoloras sin opalescencia ni precipitación. Los cambios en el porciento de péptidos en sus respectivos picos principales que se observan por RP-HPLC después de 4 semanas se resumen en la Tabla 15. La pérdida en porciento del pico principal no cambia significativamente para el Ejemplo 1 cuando se formula como un agente único en comparación con las co-formulaciones con el coagonista de GIP-GLP-1 en todas las formulaciones probadas. El coagonista de GIP-GLP-1 exhibe una pérdida constante en el porcentaje del pico principal cuando se formula como un agente único frente a las co-formulaciones con el Ejemplo 1 o el Ejemplo 3. Los datos indican que los Ejemplos 1 y 3 tienen una estabilidad aceptable cuando se formulan como un agente único o se formulan conjuntamente con un coagonista de GIP-GLP-1, y que los Ejemplos 1 y 3 no afectan negativamente la estabilidad del coagonista de GIP-GLP-1 en co-formulación.

Tabla 15.

Compuesto(s)	Formulación	Cambio en el % del pico principal del análogo del glucagón			Cambio en el % del pico principal del coagonista de GIP-GLP-1		
		4 °C	25 °C	40 °C	4 °C	25 °C	40 °C
Ejemplo 1	T7	-1,23	-2,91	-4,69	N/A		
	T7m	-0,6	-0,15	-2,36			
	T7N	-0,29	-1,39	-4,19			
	T7Nm	-0,38	-1,71	-3,93			
Ejemplo 1 + coagonista de GIP-GLP-1	T7	-1,57	-0,26	-3,59	-0,37	-0.37	-3.35
	T7m	-1,19	-0,92	-2,67	0,54	0.35	-3.76
	T7N	-0,25	-0,89	-2,15	-0,21	-0.57	-4.42
	T7Nm	-1,22	-1,94	-3,78	-0,71	-1.07	-5.50
Ejemplo 3	T7	-2,23	-7,00	-1,78	N/A		
	T7m	0,92	1,23	-0,78			
	T7N	-1,78	-6,13	-2,15			
	T7Nm	0,11	-0,76	-2,02			
Ejemplo 3 + coagonista de GIP-GLP-1	T7	-0,07	-7,51	-0,80	-0,40	-0.40	-4.14
	T7m	-3,17	-4,12	-5,08	-1,23	-1.23	-5.40
	T7N	-3,26	-7,50	-6,37	-0,22	-1.90	-6.12
	T7Nm	-2,75	-3,24	-3,35	-0,92	-0.87	-4.73
Coagonista de GIP-GLP-1	T7	N/A			-0,59	-2,12	-5,25
	T7m				0,10	-0,50	-4,3
	T7Nm				-0,85	-1,14	-4,66

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

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

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

La recuperación total del pico para todas las muestras de estabilidad está dentro del 5 % por RP-HPLC y SEC-HPLC. Todas las formulaciones permanecen transparentes e incoloras sin opalescencia ni precipitación. Los cambios en el porciento de compuestos en sus respectivos picos principales que se observan por SEC-HPLC después de cuatro semanas, se resumen en la Tabla 16. Los Ejemplos 1 y 3 son generalmente estables y no muestran una pérdida significativa del pico principal. El Ejemplo 1 no exhibe menos estabilidad cuando se formula conjuntamente con dulaglutida en comparación con las formulaciones del agente único. El Ejemplo 3 muestra un poco menos de estabilidad en la formulación conjunta con dulaglutida en comparación con las formulaciones del agente único. El agonista de GLP-1R no exhibe menos estabilidad cuando se formula conjuntamente con el Ejemplo 1 o 3 en comparación con las formulaciones del agente único.

Tabla 16.

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

Como se observó por RP-HPLC, las tendencias de estabilidad son similares a las observadas por SEC-HPLC. Los cambios en el porcentaje de compuestos en sus respectivos picos principales que se observan por RP-HPLC después de cuatro semanas se resumen en la Tabla 17. Los Ejemplos 1 y 3 son generalmente estables y no muestran una pérdida significativa del pico principal. El Ejemplo 1 no exhibe menos estabilidad cuando se formula conjuntamente con el agonista de GLP-1R en comparación con las formulaciones del agente único. El Ejemplo 3 muestra un poco menos de estabilidad en la formulación conjunta con el agonista de GLP-1R en comparación con las formulaciones del agente único. El agonista de GLP-1R no exhibe menos estabilidad cuando se formula junto con cualquiera de los ejemplos en comparación con las formulaciones del agente único.

Tabla 17.

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

Secuencias

SEQ ID NO 1 - Glucagón humano
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNT

SEQ ID NO: 2 - GLP-1 humano
HAEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGR

SEQ ID NO: 3 - OXM humano
HSQGTFTSDYSKYLDSRRAQDFVQWLMNTKRNRNNIA

SEQ ID NO: 4 - GIP humano
YAEGTFISDYSIAMDKIHQQDFVNWLLAQKGKKNDWKHNITQ

SEQ ID NO: 5 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que

X_1 es Aib;
X_2 es T o L;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-}CO\text{-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$, en el que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;
X_5 es E o A;
X_6 es T o E;
X_7 está ausente o es un péptido que se selecciona del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;
y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado.

SEQ ID NO: 6 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4FVX_5WLLEX_6X_7$ en el que

X_1 es Aib;
X_2 es T;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con $([2\text{-}(2\text{-Amino-etoxi})\text{-etoxi}]\text{-acetil})_2\text{-}(\gamma Glu)_a\text{-CO-}(CH_2)_b\text{-}CO_2H$ en el que a es 2 y b es 16;
X_5 es E;
X_6 es T;
X_7 es GPSSGAPPPS;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 7 - Agonista del receptor de glucagón

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que:

X_1 es Aib,
X_2 es T;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 2 y b es 18;
X_5 es E;
X_6 es T;
X_7 es GPSSGAPPPS;
y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 8 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que:

X_1 es Aib;
X_2 es L;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 2 y b es 16;
X_5 es E;
X_6 es T; y
X_7 es GPSSGAPPPS;
y en el que el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 9 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que X_1 es Aib;
X_2 es T;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 2 y b es 16;
X_5 es E;
X_6 es T; y
X_7 es GPSSG;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 10 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$

en el que X_1 es Aib;
X_2 es T;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 2 y b es 18;
X_5 es E;
X_6 es T; y
X_7 es GPSSG;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 11 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que

X_1 es Aib;
X_2 es T;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 1 y b es 16;
X_5 es A;
X_6 es E;
X_7 está ausente; y
el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal.

SEQ ID NO: 12 - Agonista del receptor de glucagón
$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que

X_1 es Aib;

X_2 es T;

X_3 es Aib;

X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetilo)$_2$- (yGlu)$_a$-CO- (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 1 y b es 18;

X_5 es A;

X_6 es E;

X_7 está ausente; y

el aminoácido C-terminal es ácido C-terminal.

SEQ ID NO: 13 - Coagonista de GIP-GLP

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQX_3AX_4VQWLIAGGPSSGAPPPS$; en el que

X_1 es Aib;
X_2 es Aib;
X_3 es K, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 1 o 2 y b es 10 a 20;
X_4 es Phe o 1-naftilalanina (1-Nal);
y el aminoácido C-terminal está opcionalmente amidado.

SEQ ID NO: 14 - Coagonista de GIP-GLP

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQX_3AX_4VQWLIAGGPSSGAPPPS$; en el que

X_1 es Aib;
X_2 es Aib;
X_3 es K, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 2 y b es 18;
X_4 es 1-Nal;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 15 - Coagonista de GIP-GLP

$YX_1EGTFTSDYSIX_2LDKIAQX_3AX4VQWLIAGGPSSGAPPPS$; en el que

X_1 es Aib;
X_2 es Aib;
X_3 es K, que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$- (γGlu)$_a$-CO (CH_2)$_b$-CO_2H en el que a es 1 y b es 18;
X_4 es Phe;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal.

SEQ ID NO: 16 - Agonista del receptor de glucagón

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que

X_1 es Aib;
X_2 es T o L;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_a$-CO-(CH_2)$_b$-CO_2H, en el que a es 2 y b es 14 a 24;
X_5 es E;
X_6 es T;
X_7 es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;
y el aminoácido C-terminal está amidado.

SEQ ID NO: 17 - Agonista del receptor de glucagón

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en el que

X_1 es Aib;
X_2 es T;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_a$-CO-(CH_2)$_b$-CO_2H, en el que a es 1 y b es 14 a 24;
X_5 es A;
X_6 es E; y
X_7 está ausente.

Listado de Secuencias

<110> ELI LILLY AND COMPANY

<120> AGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN

<130> X20416

<150> 62/246,199
<151> 2015-10-26

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

<210> 2
<211> 30
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

<210> 3
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

Arg Asn Asn Ile Ala
        35
```

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

<400> 4

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

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

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

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

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

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

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

<400> 5

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

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

<210> 6
<211> 39
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

<400> 6

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


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


Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
        35
```

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

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

<400> 7

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
        35
```

<210> 8
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

<400> 8

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
        35
```

<210> 9
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

<220>

<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (16)..(16)
<223> Xaa en la pos. 16 es ácido alfa aminoisobutírico

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

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

<400> 9

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

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

Ser Gly
```

<210> 10
<211> 34
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

<400> 10

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

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

Ser Gly

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

<220>
<223> contrucción sintética

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

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

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

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

<400> 11

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

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

<210> 12
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la pos. 20 es Lys que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en el que a es 1 y b es 18

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

<400> 12

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

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

<210> 13
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (20)..(20)
<223> Xaa en la pos. 20 es Lys que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en el que a es 1 o 2 y b es 10 a 20

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

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

<400> 13

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
```

35

<210> 14
<211> 39

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es la pos. 2 es ácido alfa aminoisobutírico

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

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

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

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

<400> 14

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
        35
```

<210> 15
<211> 39
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (20)..(20)

<223> Xaa en la pos. 20 es Lys que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de Lys con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)2-(gamma-Glu)a-CO-(CH2)b-CO2H en el que a es 1 y b es 18

<220>
<221> MOD_RES
<222> (39)..(39)
<223> Ser en la pos. 29 está amidada como una amida primaria C-terminal

<400> 15

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

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

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
        35
```

<210> 16
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (24)..(24)
<223> Xaa como pos. 24 es Glu

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (29)..(29)
<223> Xaa como pos. 29 es Thr

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

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 30
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> construcción sintética

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

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

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

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

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (24)..(24)
<223> Xaa en la pos. 24 es Ala

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (29).. (29)
<223> Xaa en la pos. 29 es Glu

<220>
<221> MISC_CARACTERÍSTICA
<222> (30)..(30)
<223> Xaa en la pos. 30 está ausente

<400> 17

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto agonista del receptor de glucagón que comprende la fórmula:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en la que
X_1 es Aib;
X_2 es T o L;
X_3 es Aib;
X_4 es K que se modifica químicamente mediante conjugación con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral K con ([2-(2-Amino-etoxi)-etoxi]-acetil)$_2$-(γGlu)$_a$-CO-(CH$_2$)$_b$-CO$_2$H, en la que a es 1 o 2 y b es 14 a 24;
X_5 es E o A;
X_6 es T o E;
X_7 está ausente o es un péptido seleccionado del grupo que consiste en GPSSGAPPPS y GPSSG;
y el aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria C-terminal (SEQ ID NO: 5);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Un compuesto agonista del receptor de glucagón que consiste en la fórmula:

$YX_1QGTFX_2SDYSKYLDX_3KKAX_4EFVX_5WLLEX_6X_7$ en la que

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

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

3. El agonista del receptor de glucagón de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que la actividad del agonista del receptor de glucagón en el receptor de glucagón es al menos 100 veces mayor que la potencia del agonista del receptor de glucagón en el receptor GLP-1.

4. Un receptor de glucagón contra un compuesto que tiene una estructura seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; SEQ ID NO:11 y SEQ ID NO:12.

5. El agonista del receptor de glucagón de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, para su uso en terapia.

6. El agonista del receptor de glucagón de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento de DMT2, obesidad, enfermedad del hígado graso, NAFLD, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia o hipoglucemia nocturna.

7. El agonista del receptor de glucagón de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con uno o más agentes terapéuticos adicionales seleccionados del grupo que consiste en agonistas de GLP-1R, coagonistas de GIP-GLP-1 y agonistas del receptor de insulina en el tratamiento de DMT2, obesidad, NAFLD, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia o hipoglucemia nocturna.

8. El agonista del receptor de glucagón de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con dulaglutida en el tratamiento de DMT2, obesidad, NAFLD, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia o hipoglucemia nocturna.

9. El agonista del receptor de glucagón de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 para su uso en combinación simultánea, separada o secuencial con un coagonista de GIP-GLP-1 que tiene la estructura de la SEQ ID NO: 15 en el tratamiento de DMT2, obesidad, NAFLD, NASH, dislipidemia, síndrome metabólico, hiperinsulinemia o hipoglucemia nocturna.

10. Una composición farmacéutica que comprende el agonista del receptor de glucagón de una cualquiera de las Reivindicaciones 1-4 y un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

11. La composición farmacéutica de la reivindicación 10, que comprende además un agente terapéutico adicional.

12. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 en la que el agente terapéutico adicional es un agonista de GLP-1R.

13. La composición farmacéutica de la reivindicación 12, en la que el agonista de GLP-1R es dulaglutida.

14. La composición farmacéutica de la reivindicación 11 en la que el agente terapéutico adicional es un coagonista de GIP-GLP-1.

15. La composición farmacéutica de la reivindicación 14 en la que el coagonista de GIP-GLP-1 tiene la estructura de la SEQ ID NO: 15.