SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-297842- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 14:58:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

TM TAMAYO
ROYALTIES · PATENTS · TRADEMARKS

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION
PCT FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TITULO **COAGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION**

DOMICILIO **INDIANAPOLIS, USA.**

74. **APODERADO** **CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ**

22. BOGOTA, D.C. **20 de diciembre de 2013**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-297842- -00000-0000
Fecha: 2013-12-20 14:58:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

9/9

dicación

C

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL -PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2 DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)

Solicitud Internacional No.	PCT/US2012/042084	**Fecha**	2012/06/12
Publicación Internacional No.	WO 2012/177443 A2	**Fecha**	2012/12/27

3 TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)

COAGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

4 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP)

5 SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
1. INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION		EXTRANJERA	

6 DATOS DEL SOLICITANTE

DIRECCIÓN	351 West 10th Street Indianapolis, IN 46202	No. TELÉFONO	
CIUDAD	INDIANAPOLIS	CORREO ELECTRÓNICO	
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	
PAÍS DE RESIDENCIA	USA		

7 INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

	APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD
1.	DIMARCHI	Richard, D.	US
2.	SMILEY	David L	US
3.			
4.			
5.			

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 DATOS INVENTOR (ES)

	PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1.	US	Indiana	Carmel	10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033, US
2.	US	Indiana	Bloomington	1013 Sherbrooke Drive, Bloomington, IN 47401 (US)
3.				
4.				
5.				

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
MAYA RODRIGUEZ	Carlos Orlando	C.C .17117818 T.P .17.402

DIRECCIÓN	Cra. 13 A No. 28-38 Ofc. 230 MZ 2 PARQUE BAVARIA	No. TELÉFONO	3 419841
CIUDAD	BOGOTÁ D.C.	CORREO ELECTRÓNICO	consultas@tmtamayo.net
PAÍS	COLOMBIA	No. RADICACIÓN DE PROTOCOLO DE PODER GENERAL	

10 DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1.USA	US	61/500,027	2011/06/22
2.USA	US	61/547,360	2011/10/14
3.			

11 DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12 DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13 REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☒ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐
Universidades públicas o privadas ☐
Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14 AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☒ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	**COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO**	**N°** 13-131602	**Fecha** 19-12-2013
	COMPROBANTE POR REIVINDICACIÓN ADICIONAL A 10	**No**	**Fecha:**

16 FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL

Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)

C. O. Maya

CARLOS ORLANDO MAYA RODRIGUEZ (Apoderado)

17 ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 188
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 30
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios: 4
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☒ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☒ Arte final 12 x 12.
8. ☒ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso.
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medianas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 131602

Bogotá D.C., Diciembre 19 de 2013 - 11:43:50

RECIBIDO DE : TM TAMAYO Y ASOCIADOS LTDA NI 830.091.650

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	561163853	19/12/2013	1.579.200.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCION	500.000.00	500.000.00
				$500.000.00

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-297842- -00000-0000
Fecha: 2013-12-20 14:58:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

COLOMBIA

CECBA - LEY404 GCBA LEGALIZACION 090728 329985 28/07/2009 12:47:55 $35.00

COLEGIO DE ESCRIBANOS · CIUDAD DE BUENOS AIRES · CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

ACTUACION NOTARIAL LEY 404

N 011082583

FOLIO 1.318.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO SEISCIENTOS CUARENTA Y NUEVE.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a veintidos de julio de dos mil nueve, ante mi, Escribano Autorizante, COMPARECE don **Daniel GOYTIA**, argentino, mayor de edad, casado, Libreta de Enrolamiento número 4.526.965, domiciliado en Bartolomé Mitre 226, 4º piso, de esta Ciudad.- El compareciente es persona de mi conocimiento, doy fe, así como que DICE: **I.-** Que por escritura de fecha 9 de abril de 2008, pasada ante mí al folio 932 del Protocolo de este Registro, al que me remito, doy fe, se protocolizó un **Poder** otorgado por **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION**, con domicilio en 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, US, a su favor, el que transcripto en sus partes pertinentes literalmente DICE: "... **Poder** - El abajo firmante - (1) - **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION** - Domiciliado en - (2) - 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, US, por el presente otorga a **DANIEL GOYTIA** domiciliado en Buenos Aires, Argentina, poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean estas administrativas y/o judiciales, la obtención de **"Patentes, Marcas, Modelos, Diseños y sus renovaciones"** y realizar todos los trámites conducentes para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales todos los trámites necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones, protestas, apelaciones y demandas; desistir, arreglar y transigir; aceptar cesiones y transferencias; solicitar testimonios; recibir documentos y otros valores; justificar explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y escrituras públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea

N 011082583

como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue. Este documento es efectivo a partir del 31 de enero de 2008 ...".- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandato relacionado.- **II.-** Continúa diciendo el compareciente que viene por la presente a **SUSTITUIR** el citado mandato, reservándose para si las facultades, a favor de **"CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS" y/o Carlos Orlando Maya Rodriguez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Graciela Florez y/o Clara Cortes Charry y/o Mayerling Rocio Castelblanco S.**, con domicilio en Carrera 13A Nº 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Central Bavaria, Bogotá, **COLOMBIA**, para actuar en dicho país con todas y cada una de las facultades enumeradas precedentemente.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, aceptó y firmó, por ante mi, doy fe.- "SIGUE UNA FIRMA".- Esta mi sello.- Ante mi: ALEJANDRO M. LIPORACE.- CONCUERDA con su matriz que pasó ante mi, al folio 1.318 del Protocolo del Registro 1331 a mi cargo.- PARA LOS APODERADOS expido esta **PRIMERA COPIA** en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 011082583 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

LEGALIZACION
LEY 404

L 008968001

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ~~ALEJANDRO MARIA LIPORACE~~ **obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el Nº** ~~090728329985/4~~ **La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.**

Buenos Aires, ~~Martes 28 de Julio de 2009~~

COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZACION
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

ESC. RAQUEL COLOMER
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

SERIE A 2597588

REPÚBLICA ARGENTINA

MINISTERIO *de*
RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

CANCILLERIA ARGENTINA

APOSTILLE
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. País_____ARGENTINA_____
   El presente documento público
2. Ha sido firmado por RAQUEL COLOMER
3. Quien actúa en calidad de FUNCIONARIO HABILITANTE
4. Lleva el sello/timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE CAPITAL FEDERAL
5. En BUENOS AIRES 6. El día 29/07/2009
7. Por__UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES__
   MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO
   INTERNACIONAL Y CULTO_____
8. Bajo el Número: 149647/2009
9. Sello/Timbre: 39

LA PRESENTE LEGALIZACION TIENE COMO UNICO EFECTO AUTENTICAR LA FIRMA Y CARACTER DEL OTORGANTE. SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

10. Firma
Dn. GUSTAVO EZEQUIEL SANTA ANA
Unidad de Coordinación Legalizaciones
Ministerio de Relaciones Exteriores
Comercio Internacional y Culto

Tipo de Documento: ACTUACION NOTARIAL
Titular del Documento: DANIEL GOYTIA

2009149647

1939917F6B9031883ED305C87367DFC8

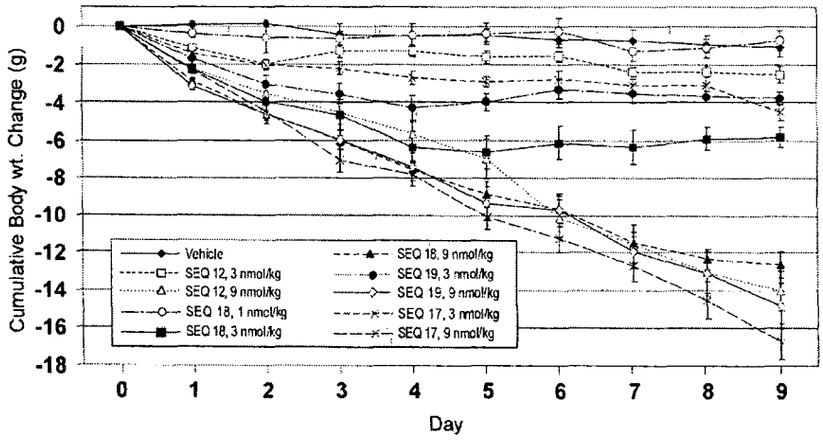

Cumulative Body wt. Change (g)
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Day
Vehicle
SEQ 12, 3 nmol/kg
SEQ 12, 9 nmol/kg
SEQ 18, 1 nmol/kg
SEQ 18, 3 nmol/kg
SEQ 18, 9 nmol/kg
SEQ 19, 3 nmol/kg
SEQ 19, 9 nmol/kg
SEQ 17, 3 nmol/kg
SEQ 17, 9 nmol/kg

FIG. 1

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:	Fecha: 13 / 12 / 20 (AAAA / MM / DD)	Recorrido:
2520		3

Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador: | Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-297842	0	2
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	**Otro**
Item	***Soporte Documental***
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	**Otro**

Observaciones:

El CD Anexo contiene un total de 9 Archivos 9 en Formato pdf, los cuales fueron procesados.

grisalda

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 13-297842- -00000-0000

Fecha: 2013-12-20 14:58:33 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 8

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

De la AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para: Breen, John P., Abogado BARNES & THORNBURG, LLP 11 South Meridian Street Indianapolis IN 46204 Estados Unidos de América	**PCT** **NOTIFICACIÓN DE REMISIÓN DEL INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL Y DE LA OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL, O LA DECLARACIÓN** **(Norma 44.1 del PCT)** Fecha de remisión (día/mes/año) 21 de de febrero de 2013 (21-02-2013
Referencia de archivo del Solicitante o Agente 32993-221482	**PARA OTROS TRAMITES** Véanse los párrafo 1 y 4 a continuación
Solicitud de Patente Internacional Nº PCT/US2012/042084	Fecha de presentación internacional (día/mes/año): 12 de junio de 2012 (12-06-2012)
Solicitante: INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al	

1. [x] Por la presente se notifica al solicitante que el informe de búsqueda internacional y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se han establecido y se transmiten con la presente:

Presentación de modificaciones y testimonio conforme al Artículo 19.

El solicitante tiene derecho, si lo desea, de modificar las reivindicaciones de la solicitud de patente internacional

(véase la Norma 46):

¿Cuándo? El plazo para presentar dichas modificaciones es normalmente de 2 meses desde la fecha de transmisión del Informe de Búsqueda Internacional.

¿Dónde? Directamente a la Oficina Internacional de la WIPO, 34, chemin de Colombettes, 1211 Ginebra 20, Suiza, Fax: (41-22)338-8270

Para obtener instrucciones más detalladas, véanse las notas en la página adjunta.

2. [] Por la presente se notifica al solicitante que no se establecerá informe de búsqueda internacional y que la declaración conforme al Artículo 17(2)(a) a tal efecto y la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional se transmiten con la presente.

3. [] Con respecto la protesta contra el pago de (un) arancel(es) adicionales conforme a la Norma 40.2, se notifica al solicitante que:

[] la protesta así como la resolución sobre ella ha sido transmitida a la Oficina Internacional junto con el pedido del solicitante de remitir los textos de la protesta y de la resolución sobre ella a las Oficinas designadas.

[] aún no ha habido resolución sobre la protesta; el

solicitante será notificado en cuanto haya una resolución.

4. **Recordatorios:**

Poco después de los **18 meses** desde la fecha de prioridad, la Oficina Internacional publicará la solicitud de patente internacional. Si el solicitante desea impedir o postergar la publicación, un escrito de retiro de la solicitud de patente internacional, o de la reivindicación de prioridad, deberán ser presentados ante la Oficina Internacional según lo previsto en las Normas 90bis.1 y 90bis.3, respectivamente, antes de la finalización de los preparativos técnicos para la publicación internacional.

El solicitante podrá presentar ante la Oficina Internacional observaciones en forma informal acerca de la opinión escrita de la Autoridad de Búsqueda Internacional. La Oficina Internacional remitirá una copia de esas observaciones a todas las oficinas designadas a menos que se haya establecido o se deba establecer un informe del examen preliminar internacional. Estas observaciones también estarían disponibles para el público pero no con anterioridad al vencimiento del plazo de 30 meses des de la fecha de prioridad.

Dentro de los **19 meses** desde la fecha de prioridad, deberá presentarse un pedido de examen preliminar internacional si el solicitante desea postergar el ingreso en la fase nacional

hasta los 30 meses desde la fecha de prioridad (en algunas Oficinas más); de lo contrario el solicitante deberá, dentro de los 20 meses, realizar los trámites previstos para el ingreso en la fase nacional ante aquellas Oficinas designadas. Con respecto a las demás Oficinas designadas, el plazo de 30 meses (o con posterioridad) será aplicable aún cuando no se presente ningún pedido dentro de los 19 meses.

Véase el Anexo al Formulario PCT/IB/301 y, para detalles acerca de los plazos aplicables, Oficina por Oficina, véase la Guía del Solicitante de PCT, Volumen II, Sedes Nacionales y el sitio de Internet de la WIPO.

Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/KR Oficina de Propiedad Intelectual Coreana Complejo Gubernamental-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Seo-gu, Daejeon 302-701, República de Corea Tel. 82-42-472-7140	Funcionario Autorizado: COMISARIO Nº Telefónico: 82-42-481-8754

*Atención:

Las copias de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional se podrán buscar en el siguiente sitio web en inglés de la Oficina de la Propiedad Intelectual de Corea durante tres meses desde la fecha de remisión del informe de búsqueda internacional.

http://www.kipo.gov.kr/en/→ PCT Services → PCT-Services

ID: número de publicación de la solicitud de patente internacional PCT

Contraseña (PW): **ADBWX9K6**

Las preguntas relacionadas con el Informe de Búsqueda Internacional PCT o la Opinión Escrita preparada por la Oficina de la Propiedad Intelectual de Corea (KIPO) como Autoridad de Búsqueda Internacional podrán ser respondidas no solamente por la KIPO sino también a través del IPKC (Centro Corea de la Propiedad Intelectual), sito en Vienna, VA, que funciona como Escritorio de Ayuda de PCT para solicitantes de PCT.

Página principal: http://www.ipkcenter.com

Correo electrónico: ipkc@ipkcenter.com

Número telefónico: +1 703 388 1066

Fax: +1 703 388 1084

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

PCT

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(Artículo 18 y Normas 43 y 44 del PCT)

<table>
<tr><td>Referencia de Archivo del Solicitante o agente:
32993-221482</td><td colspan="2">PARA REALIZAR OTROS TRAMITES
Véase Notificación de Transmisión de Informe de Búsqueda Internacional (Formulario PCT/ISA/220) y, si fuere aplicable, del punto 5 a continuación.</td></tr>
<tr><td>Solicitud Internacional No:
PCT/US2012/042084</td><td>Fecha de Presentación Internacional (día/mes/año): 12 de junio de 2012 (12-06-2012)</td><td>Fecha de Prioridad (Más antigua) (día/mes/año): 12 junio de 2011 (12-06-2011)</td></tr>
<tr><td colspan="3">Solicitante:
INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al</td></tr>
<tr><td colspan="3">Este informe de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante conforme al Artículo 18. Se transmite una copia del mismo a la Oficina Internacional.

Este informe de búsqueda internacional consta de _6_ páginas.</td></tr>
</table>

[X] Está acompañado asimismo de una copia de cada documento de arte previo citado en el informe

1. Fundamento de Informe

a. Con respecto al idioma, la búsqueda internacional se llevó a cabo basada en:

[x] la solicitud internacional en el idioma en que ésta se presentó.

[ ] una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el idioma de la traducción provista para los fines de la búsqueda internacional (Normas 12.3(a) y 23.1(b)).

b. [] Este informe de búsqueda internacional se ha establecido tomando en cuenta la rectificación de un error obvio autorizada o notificada por a esta Autoridad conforme a la Norma 91 (Norma 43.6bis(a)).

c. [x] Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional, véase el Casillero N° I

2. [x] Ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Véase Casillero N° II)

3. [] Falta Unidad de Invención (Véase Casillero N° III).

4. Con respecto al título:

[x] el texto se aprueba tal como lo presentó el solicitante

[] el texto ha sido establecido por esta Autoridad como

sigue:

5. Con respecto al resumen:

[x] el texto es aprobado como lo presentó el solicitante

[] el texto ha sido establecido, conforme a la Norma 38.2(b), por esta Autoridad como aparece en el Casillero Nº IV. El Solicitante puede, dentro de un mes desde la fecha de remisión de este informe de búsqueda internacional, presentar comentarios ante esta Autoridad.

6. Con respecto a los dibujos,

a. La Lámina de dibujos que se publicará con el resumen es: Figura No. 1.

[x] sugerida por el Solicitante

[] seleccionada por esta Autoridad, debido a que el Solicitante no sugirió una Figura.

[] seleccionada por esta Autoridad, debido a que ésta es la figura que mejor caracteriza a la invención

b. [] No se debe publicar ninguna de las figuras con el resumen.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2012/042084

Casillero Nº I. Secuencia de Nucleótidos y/o aminoácidos (Continuación del Punto 1.c de la página 1)

1. Con respecto a cualquier secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se llevó a cabo basado en:

(a) medios:

[ ] papel

[x] forma electrónica

(b) (tiempo)

[] en la solicitud de patente internacional como se presentó

[x] junto con la solicitud de patente internacional en forma electrónica

[] posteriormente ante esta Autoridad para los fines de la búsqueda

2. [] Además, en caso de que se haya presentado o provisto más de una versión o copia de un listado de secuencias y/o tabla relacionada con él, se prestaron las declaraciones juradas

exigidas de que la información de las copias posteriores o adicionales es idéntica a aquella de la solicitud de patente como se presentó o no va más allá de la solicitud de patente como se presentó, según corresponda.

3. Observaciones adicionales:

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud de Patente Internacional N° PCT/US2012/042084

Casillero Nº II. Observaciones cuando ciertas reivindicaciones se consideraron no buscables (Continuación del punto 2 de la página 1).

El presente informe de búsqueda internacional no se ha establecido con respecto a ciertas reivindicaciones conforme a al Artículo 17(2)(a) por los siguientes motivos:

1. [x] Reivindicaciones N°: 26, 27

porque se relacionan con un objeto que no se requiere que busque esta Autoridad, a saber:

Las reivindicaciones 26 y 27 se refieren a un método de tratamiento del cuerpo humano mediante terapia y por lo tanto se relacionan con un objeto que esta Autoridad de Búsqueda Internacional no exige que se busquen, conforme al Artículo 17(2)(a)(1) y a la Norma 39.1(iv) de las Reglamentaciones del PCT.

2. [x] Reivindicaciones N°: 15, 19-22, 25, 27

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos en tal magnitud que no se puede realizar una búsqueda significativa, específicamente:

Las reivindicaciones 15, 19-22, 25, 27 son poco claras porque

se refieren a varias reivindicaciones dependientes que no cumplen con la Norma 6.4(a) del PCT.

3. [x] Reivindicaciones Nº: 12-14, 16-18, 23, 24, 26,28-30.
porque son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de acuerdo con la segunda y tercera oraciones de la Norma 6.4(a).

Casillero Nº III. Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 3 de la página 1)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró varias invenciones en esta solicitud de patente internacional, a saber:

1. [] Como todos los aranceles de búsqueda adicionales se pagaron oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional abarca todas las reivindicaciones buscables.

2. [] Como las reivindicaciones buscables pudieron buscarse sin esfuerzo que justifique un arancel adicional, esta Autoridad no intima al pago de ningún arancel adicional.

3. [] Como ninguno de los aranceles de búsqueda adicionales requeridos se pagaron oportunamente por el solicitante, este

informe de búsqueda internacional abarca solamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron aranceles, específicamente las reivindicaciones N°:

4. [] El solicitante no pagó ninguno de los aranceles de búsqueda adicionales. En consecuencia, este informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer lugar en las reivindicaciones; está abarcada por las reivindicaciones N°:

Observación Bajo Protesta:

[] Los aranceles de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante y cuando correspondía por el arancel de protesta

[] Los aranceles de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante pero el arancel de protesta aplicable no se pagó dentro del plazo especificado en la invención.

[] Ninguna protesta acompañó el pago de los aranceles de búsqueda adicionales.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL	Solicitud Internacional N° PCT/US2012/042084

A. Clasificación del Objeto:

A61K38/26 (2006.01)i ***A61K 38/17*** (2006.01)i ***A61K38/16*** (2006.01)i ***A61P 3/10*** (2006.01)i ***A61P 3/04*** (2006.01)i ***A61P 3/00*** (2006.01)i

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o con la clasificación nacional e IPC.

B. CAMPOS DE BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido por símbolos de clasificación)

*A61K38/26; A61P 3/10; A61K 38/*00; C07K 14/605; *C07D 241/00*

Documentación buscada además de la documentación mínima en la medida en que tales documentos están incluidos en los campos de búsqueda:

Modelos de utilidad japoneses y solicitudes de registros de modelos de utilidad coreanos

Modelos de utilidad japoneses y solicitudes de registros de modelos de utilidad japoneses.

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda usados):

eKOMPASS (KIPO Interna) y palabras clave: acilación,

alquilación, glucagón, GLP-1, GIP, actividad		
C. Documentos Considerados Relevantes		
Categoría*	Cita de documento, indicando, si corresponde, los pasajes relevantes	Relevante para la reivindicación N°
A	US 2010-0190701 Al (DAY et al.) 29 de julio de 2010 Véanse el resumen y las reivindicaciones 66-91.	1-11
A	WO 2009-155258 A2 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 de diciembre de 2009 Véanse el resumen y las reivindicaciones 1-50.	1-11
A	W0 2009-155257 Al (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 de diciembre de 2009 Véanse el resumen y las reivindicaciones 1-43.	1-11
A	WO 2000-042026 Al (NOVO NORDISK et al.) 20 de julio de 2000 Véanse el resumen y las	1-11

	reivindicaciones 1-48.	

[] Se mencionan otros documentos en la continuación del Casillero C. [x] Véase el anexo de familia de patentes

* Categorías especiales de documentos citados:	"T": documento posterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o a la fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para comprender un principio o teoría que sustenta la invención.
"A": documento que define el estado general del arte que no se considera de particular relevancia	
"E": documento anterior pero publicado en la fecha de presentación internacional o con posterioridad a ella.	"X": documento de particular relevancia: la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que implica un paso inventivo cuando el documento se toma solo.
"L": documento que puede arrojar dudas sobre la reivindicación de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra cita o por otra razón especial (especificada).	"Y": documento de particular relevancia: la invención reivindicada no puede considerarse que implica un paso inventivo cuando el
"O": documento que refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otro medio.	
"P": documento publicado antes	

de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	documento se combina con otro u otros documentos, siendo dicha combinación obvia para un experto en el arte. "&": documento miembro de la misma familia de patentes.
Fecha de la finalización efectiva de la búsqueda internacional 20 de febrero de 2013 (20-02-2013)	Fecha de envío del informe de búsqueda internacional 21 de febrero de 2013 (21-02-2013)
Nombre y domicilio para correspondencia de la ISA/KR Fax: 82-42-472-7140	Funcionario Autorizado KIM, Seung Beom N° Telefónico: 82-42-481-3371

Formulario PCT/ISA/210 (página 2) (julio de 2009)

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud de Patente Internacional Nº
PCT/US2012/042084

Documento de patente citado en el niforme de búsqueda	Fecha de publicación	;Miembro(s) de familia de patentes	Fecha de publicación
US 2010-0190701 A1	29.07.2010	AR 065349 A1	03.06.2009
		AU 2008-216265 A1	21.08.2008
		CA 2677932 A1	21.08.2008
		CL 4792008 A1	22.08.2008
		CN 101790538 A	28.07.2010
		CR 11028 A	29.10.2009
		EA 200901108 A1	26.02.2010
		EP 2111414 A2	28.10.2009
		EP 2487184 A1	15.08.2012
		IL 200396 D0	29.04.2010
		JP 2011-511753 A	14.04.2011
		KR 10-2009-0119876 A	20.11.2009
		MA 31242 B1	01.03.2010
		MX 2009008241 A	08.10.2009
		PA 8769301 A1	18.12.2008
		PE 01082009 A1	15.02.2009
		TW 200848423 A	16.12.2008
		WO 2008-101017 A2	21.08.2008
		WO 2008-101017 A3	18.12.2008
WO 2009-155258 A2	23.12.2009	AR 072160 A1	11.08.2010
		AU 2009-260302 A1	23.12.2009
		CA 2728284 A1	23.12.2009
		CN 102123723 A	13.07.2011
		EA 201100038 A1	30.08.2011
		EP 2300037 A2	30.03.2011
		EP 2300037 A4	06.07.2011
		IL 209750 D0	28.02.2011
		JP 2011-524419 A	01.09.2011
		MX 2010013454 A	21.01.2011
		PA 8830501 A1	27.07.2010
		PE 02552010 A1	25.04.2010
		TW 201010716 A	16.03.2010
		US 2011-257092 A1	20.10.2011
		WO 2009-155258 A3	18.02.2010
WO 2009-155257 A1	23.12.2009	AU 2009-260301 A1	23.12.2009
		CA 2727161 A1	23.12.2009
		CN 102088989 A	08.06.2011
		EP 2307037 A1	13.04.2011
		EP 2307037 A4	03.08.2011
		IL 209287 D0	31.01.2011
		JP 2011-524418 A	01.09.2011
		KR 10-2011-0039230 A	15.04.2011
		TW 201010730 A	16.03.2010
		US 2011-190200 A1	04.08.2011
WO 2000-042026 A1	20.07.2000	AU 2000-30335 A1	01.08.2000
		EP 1147094 A1	24.10.2001

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud de Patente Internacional Nº
PCT/US2012/042084

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de familia de patentes	Fecha de publicacion
		JP 2002-534512 A	15.10.2002
		US 06927214 B1	09.08.2005

221482

PCT/US2012/042084

IP FILES

MAR 01 2013

BARNES & THORNBURG LLP

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

JOHN P.BREEN, ESQ.

BARNES & THORNBURG LLP 11 SOUTH MERIDIAN STREET INDIANAPOLIS IN 46204 USA

PCT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing *(day/month/year)* 21 FEBRUARY 2013 (21.02.2013)	
Applicant's or agent's file reference 32993-221482	**FOR FURTHER ACTION** See paragraphs 1 and 4 below
International application No. **PCT/US2012/042084**	International filing date *(day/month/year)* **12 JUNE 2012 (12.06.2012)**

Applicant

INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 338 82 70

For more detailed instructions, see *PCT Applicant's Guide*, International Phase, paragraphs 9.004 . 9.011.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to any protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with any request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. Following the expiration of 30 months from the priority date, these comments will also be made available to the public.

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau before the completion of the technical preparations for international publication (Rules 90bis.1 and 90bis.3).

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19months.

For details about the applicable time limits, Office by Office, see www.wipo.int/pct/en/texts/time_limits.html and the PCT Applicant's Guide, National Chapters.

Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer COMMISSIONER Telephone No. 82-42-481-8754

Form PCT/ISA/220 (July 2010)

HB 3/13

* Attention

Copies of the documents cited in the international search report can be searched in the following Korean Intellectual Property Office English website for three months from the date of mailing of the international search report.

http://www.kipo.go.kr/en/ => PCT Services => PCT Services

ID : PCT international application number
PW : **ADBWX9K6**

Inquiries related to PCT International Search Report or Written Opinion prepared by KIPO as an International Searching Authority can be answered not only by KIPO but also through IPKC (Intellectual Property Korea Center), located in Vienna, VA, which functions as a PCT Help Desk for PCT applicants.

Homepage: http://www.ipkcenter.com
Email: ipkc@ipkcenter.com
Phone: +1 703 388 1066
Fax: +1 703 388 1084

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

IP FILES
MAR 01 2013
BARNES & THORNBURG LLP

Applicant's or agent's file reference	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
32993-221482		
International application No.	International filing date *(day/month/year)*	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)*
PCT/US2012/042084	**12 JUNE 2012 (12.06.2012)**	22 JUNE 2011 (22.06.2011)

Applicant

INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al

This International search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      ☒ the international application in the language in which it was filed
      ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6*bis*(a)).
   c. ☒ With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.
2. ☒ **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)
3. ☐ **Unity of invention is lacking** (See Box No. III)
4. With regard to the **title,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established by this Authority to read as follows:
5. With regard to the **abstract,**
   ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
   ☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.
6. With regard to the drawings,
   a. the figure of the **drawings** to be published with the abstract is Figure No. 1
      ☒ as suggested by the applicant.
      ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
      ☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
   b. ☐ none of the figure is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of :

   a. a sequence listing filed or furnished

   - ☐ on paper
   - ☒ in electronic form

   b. time of filing or furnishing

   - ☐ contained in the international application as filed
   - ☒ filed together with the international application in electronic form
   - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26, 27
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 26 and 27 are directed to a treatment method of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☒ Claims Nos.: 15, 19-22, 25, 27
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

Claims 15, 19-22, 25, 27 are unclear since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

3. ☒ Claims Nos.: 12-14, 16-18, 23, 24, 26, 28-30
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required addtional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2012/042084

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/26(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/26; A61P 3/10; A61K 38/00; C07K 14/605; C07D 241/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models
Japanese utility models and applications for utility models

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: acylation, alkylation, glucagon, GLP-1, GIP, activity

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2010-0190701 A1 (DAY et al.) 29 July 2010 See the abstract and claims 66-91.	1-11
A	WO 2009-155258 A2 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 December 2009 See the abstract and claims 1-50.	1-11
A	WO 2009-155257 A1 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 December 2009 See the abstract and claims 1-43.	1-11
A	WO 2000-042026 A1 (NOVO NORDISK et al.) 20 July 2000 See the abstract and claims 1-48.	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents,such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
20 FEBRUARY 2013 (20.02.2013)	**21 FEBRUARY 2013 (21.02.2013)**
Name and mailing address of the ISA/KR Facsimile No. 82-42-472-7140	Authorized officer KIM, Seung Beom Telephone No. 82-42-481-3371

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/US2012/042084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0190701 A1	29.07.2010	AR 065349 A1	03.06.2009
		AU 2008-216265 A1	21.08.2008
		CA 2677932 A1	21.08.2008
		CL 4792008 A1	22.08.2008
		CN 101790538 A	28.07.2010
		CR 11028 A	29.10.2009
		EA 200901108 A1	26.02.2010
		EP 2111414 A2	28.10.2009
		EP 2487184 A1	15.08.2012
		IL 200396 D0	29.04.2010
		JP 2011-511753 A	14.04.2011
		KR 10-2009-0119876 A	20.11.2009
		MA 31242 B1	01.03.2010
		MX 2009008241 A	08.10.2009
		PA 8769301 A1	18.12.2008
		PE 01082009 A1	15.02.2009
		TW 200848423 A	16.12.2008
		WO 2008-101017 A2	21.08.2008
		WO 2008-101017 A3	18.12.2008
WO 2009-155258 A2	23.12.2009	AR 072160 A1	11.08.2010
		AU 2009-260302 A1	23.12.2009
		CA 2728284 A1	23.12.2009
		CN 102123723 A	13.07.2011
		EA 201100038 A1	30.08.2011
		EP 2300037 A2	30.03.2011
		EP 2300037 A4	06.07.2011
		IL 209750 D0	28.02.2011
		JP 2011-524419 A	01.09.2011
		MX 2010013454 A	21.01.2011
		PA 8830501 A1	27.07.2010
		PE 02552010 A1	25.04.2010
		TW 201010716 A	16.03.2010
		US 2011-257092 A1	20.10.2011
		WO 2009-155258 A3	18.02.2010
WO 2009-155257 A1	23.12.2009	AU 2009-260301 A1	23.12.2009
		CA 2727161 A1	23.12.2009
		CN 102088989 A	08.06.2011
		EP 2307037 A1	13.04.2011
		EP 2307037 A4	03.08.2011
		IL 209287 D0	31.01.2011
		JP 2011-524418 A	01.09.2011
		KR 10-2011-0039230 A	15.04.2011
		TW 201010730 A	16.03.2010
		US 2011-190200 A1	04.08.2011
WO 2000-042026 A1	20.07.2000	AU 2000-30335 A1	01.08.2000
		EP 1147094 A1	24.10.2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2012/042084

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		JP 2002-534512 A	15.10.2002
		US 06927214 B1	09.08.2005

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

IP FILES
MAR 01 2013
BARNES & THORNBURG LLP

To:
JOHN P.BREEN, ESQ.

BARNES & THORNBURG LLP 11 SOUTH MERIDIAN STREET INDIANAPOLIS IN 46204 USA

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing *(day/month/year)*	**21 FEBRUARY 2013 (21.02.2013)**
Applicant's or agent's file reference 32993-221482	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below

International application No.	International filing date *(day/month/year)*	Priority date *(day/month/year)*
PCT/US2012/042084	**12 JUNE 2012 (12.06.2012)**	22 JUNE 2011 (22.06.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

A61K 38/26(2006.01)i, A61K 38/17(2006.01)i, A61K 38/16(2006.01)i, A61P 3/10(2006.01)i, A61P 3/04(2006.01)i, A61P 3/00(2006.01)i

Applicant

INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION et al

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- [X] Box No. I Basis of the opinion
- [ ] Box No. II Priority
- [X] Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- [ ] Box No. IV Lack of unity of invention
- [X] Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- [ ] Box No. VI Certain documents cited
- [X] Box No. VII Certain defects in the international application
- [ ] Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.
For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/KR	Date of completion of this opinion	Authorized officer
Facsimile No. 82-42-472-7140	20 FEBRUARY 2013 (20.02.2013)	KIM, Seung Beom Telephone No.82-42-481-3371

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43*bis*.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:

   a. a sequence listing filed or furnished
      ☐ on paper
      ☒ in electronic form

   b. time of filing or furnishing
      ☐ contained in the international application as filed.
      ☒ filed together with the international application in electronic form.
      ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additioanl copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 12-30

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 26, 27 relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

Claims 26 and 27 pertain to a method for treatment of the human by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Rule 43bis.1(b) and Rule 67.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

☒ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. 15, 19-22, 25, 27 are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

Claims 15, 19-22, 25, and 27 are unclear, since they are referring to the multiple dependent claims which do not comply with PCT Rule 6.4(a).

☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for said claims Nos. 12-30

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Istructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Istructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2012/042084

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-11	YES
	Claims	NONE	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-11	YES
	Claims	NONE	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-11	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations :

Reference is made to the following documents:

D1: US 2010-0190701 A1 (DAY et al.) 29 July 2010
D2: WO 2009-155258 A2 (INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION) 23 December 2009

D1 provides modified glucagon peptides having enhanced potency at the glucagon receptor relative to native glucagon. The peptides exhibit glucagon/GLP-1 receptor co-agonist activity (See the abstract and claims 66-91).

D2 relates to a glucagon peptide with amino acid modifications including acylation or alkylation with a C4 to C30 fatty acid (See the abstract and claims 1-50).

1. Novelty and Inventive Step

1.1 Claim 1

None of the documents cited in ISR disclose or suggest the peptide comprising or consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NOs:12-17 of claim 1. Accordingly, claim 1 is neither anticipated nor obvious to a person skilled in the art by the prior art documents, taken alone or in combination. Therefore, claim 1 is novel and involves an inventive step under PCT Article 33(2) and (3).

(Continued on the Supplemental Box.)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US2012/042084

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

Claims 12-14, 16-18, 23, 24, 26, 28-30 do not comply with PCT Rule 6.4(a), because multiple dependent claims should not serve as a basis for any other multiple dependent claim.

Supplemental Box

In case **the space in any of the preceding boxes is not sufficient.**
Continuation of:

(Box No. V)

1.2 Claims 2-7
Claims 2-7 are dependent on claim 1. Consequently, claims 2-7 are also considered to be novel and to involve an inventive step under PCT Article 33(2) and (3).

1.3 Claim 8
D1 provides a glucagon peptide identical to a variant peptide comprising an amino acid sequence that is at least 85% or 90% identical to the amino acid sequence of the peptide of claim 1. However, none of the documents cited in ISR provide the variant peptide exhibiting at least 100-fold greater selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor. Accordingly, claim 8 is not anticipated by any of the documents, nor is it obvious by the documents, taken alone or in combination. Therefore, claim 8 is novel and involves an inventive step under PCT Article 33(2) and (3).

1.4 Claims 9-11
Claims 9-11 are dependent on claim 8. Consequently, claims 9-11 are also considered to be novel and to involve an inventive step under PCT Article 33(2) and (3).

2. Industrial Applicability
The subject-matter of claims 1-11 is considered to be industrially applicable under PCT Article 33(4).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DiMarchi, Richard

<120> Co-agonistas del receptor de Glucagónn/GLP-1
<130> 31135/46342 PCT

<150> US-61/500.027
<151> 22-06-2011

<150> US-61/547.360
<151> 14-10-2011

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

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

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> Glucagón natural humano

<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> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> GLP-1

<400> 2

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

Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu
20 25 30

Val Lys Gly Arg Gly
35

<210> 3
<211> 33
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> GLP-2

<400> 3

His Ala Asp Gly Ser Phe Ser Asp Glu Met Asn Thr Ile Leu Asp Asn
1 5 10 15

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

Asp

<210> 4
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> Oxintomodulina

<400> 4

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 Asp Thr Lys Arg Asn
20 25 30

Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 5
<211> 30
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> GLP1 (7-36 amida)

<220>
<221> MOD_RES
<222> (30)..(30)
<223> amidación del extreme de C

<400> 5

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> 6
<211> 31
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CARATERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> GLP-1 (7-37 ácido)

<400> 6

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 Gly
20 25 30

<210> 7
<211> 39
<212> PRT
<213> Heloderma suspectum

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> Exendina 4

<400> 7

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

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

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

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 8

Lys Arg Asn Arg Asn Asn Ile Ala
1 5

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 9

Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 10
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 10

Gly Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 11
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<400> 11

Lys Arg Asn Arg
1

<210> 12
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARCTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> Xaa es gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (31)..(31)
<223> amidación del extreme de C

<400> 12

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

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

<210> 13
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> MOD_RES
<222> (20)..(20)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (24)..(24)
<223> Covalentemente unido a PEG

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (31)..(31)
<223> Xaa es gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (31)..(31)
<223> amidación del extreme de C

<400> 13

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

Arg Arg Ala Xaa Glu Phe Val Cys Trp Leu Leu Asp Thr Lys Xaa
20 25 30

<210> 14
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)

<223> D-Ser

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (31)..(31)
<223> Xaa es gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (31)..(31)
<223> amidación del extreme de C

<400> 14

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

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

<210> 15
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> MOD_RES

<222> (27)..(27)
<223> Xaa es sulfóxido de Metionina

<400> 15

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

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

<210> 16
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un separador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es AIB

<400> 16

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

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

<210> 17
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> Xaa es gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (31)..(31)
<223> amidación del extreme de C

<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (29)..(29)
<223> amidación del extreme de C

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> D-Ser

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un separador de gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (29)..(29)
<223> amidación del extreme de C

<400> 19

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

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

<210> 20
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> MOD_RES
<222> (31)..(31)
<223> D-Glu

<400> 20

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

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

<210> 21
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<223> Liraglutida

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (20)..(20)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu

<400> 21

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 Arg Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 22
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA
<222> (10)..(10)
<223> Acilado con un grupo acilo graso de C16 a través de un espaciador de gamma-Glu-gamma-Glu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (16)..(16)
<223> Xaa es AIB

<220>
<221> MOD_RES
<222> (28)..(28)
<223> Xaa es Orn

<400> 22

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

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

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de la:

a) SEQ ID NO: 17;

b) SEQ ID NO: 12;

c) SEQ ID NO: 13;

d) SEQ ID NO: 14;

e) SEQ ID NO: 15, o

f) SEQ ID NO: 16;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

2. El péptido de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

3. El péptido de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

4. El péptido de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

5. El péptido de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

6. El péptido de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

7. El péptido de la reivindicación 1 que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

8. Una variante de péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del péptido de la reivindicación 1, dicha variante de péptido difiere de la secuencia de aminoácidos del péptido de la reivindicación 1 en que la variante de péptido comprende una o más de la siguientes características:

a. un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado en la posición 10;

b. un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado se reemplaza con el aminoácido correspondiente del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en dicha posición o una sustitución conservativa del aminoácido natural y, opcionalmente se

introduce un nuevo aminoácido acilado o alquilado en una posición distinta;

c. la variante de péptido comprende un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrofílico en la posición 24;

d. un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrofílico se reemplaza con el aminoácido correspondiente del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en dicha posición y opcionalmente, se introduce un nuevo aminoácido unido covalentemente a un resto hidrofílico en una posición distinta;

e. el aminoácido del extremo C de la variante de péptido comprende una amida del extremo C en lugar de un alfa carboxilato del extremo C;

f. un aminoácido en cualquiera de las posiciones 1 a 29 se reemplaza con el aminoácido correspondiente del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en dicha posición;

g. o cualquier combinación de estas;

o una sal farmacéuticamente aceptable de este;

donde la variante de péptido exhibe una mejor actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural, y exhibe una selectividad de al menos 100 veces más para el receptor de GLP-1 humano en comparación con el receptor de GIP, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

9. La variante de péptido de la reivindicación 8 que comprende un resto hidrofílico unido covalentemente a un aminoácido en las posiciones 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de una extensión del extremo C, o en el extremo C, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

10. La variante de péptido de la reivindicación 8 que comprende un Cys, Lys, Orn, homocisteína y Ac-Phe unido covalentemente a un resto hidrofílico, opcionalmente, donde el Cys, Lys, Orn, homocisteína o Ac-Phe está ubicado en la posición 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de una extensión del extremo C o en el extremo C de la variante de péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

11. La variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, donde el resto hidrofílico es un polietilenglicol, opcionalmente, un PEG de peso molecular entre 10 kDa y 40 kDa, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

12. La variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende un aminoácido acilado o alquilado que comprende una cadena de alquilo de C8 a C20, una cadena de alquilo de C12 a C18 o una cadena de alquilo de C14 o C16, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

13. La variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12 que comprende un aminoácido acilado o alquilado que es un aminoácido acilado o alquilado de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, opcionalmente, donde el aminoácido de la Fórmula I es Lys, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

14. La variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 13 que comprende un aminoácido acilado o alquilado, donde el grupo acilo o el grupo alquilo está unido covalentemente al aminoácido mediante un espaciador, opcionalmente, donde el espaciador es un aminoácido o un dipéptido, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

15. La variante de péptido de la reivindicación 14, donde el espaciador comprende uno o dos residuos ácidos, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta.

16. El péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, donde la

$$\frac{\text{(EC50 en el receptor de glucagón)}}{\text{(EC50 en el receptor de GLP-1)}}$$

es de alrededor de 20 o menos, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

17. El péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, que exhibe una EC50 en el receptor de GLP-1 que es de dos a diez veces mayor a la EC50 en el receptor de glucagón, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

18. Un conjugado que comprende un péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden conjugado a un resto heterólogo, o una sal farmacéuticamente aceptable de este, donde el conjugado exhibe una mejor actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural, y exhibe una selectividad de al menos 100 veces más para el receptor de GLP-1 humano en comparación con el receptor de GIP.

19. El conjugado de la reivindicación 18, donde el resto heterólogo comprende uno o más de: un péptido, un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o fragmento de este, un polímero, un punto cuántico, una molécula pequeña, una toxina, un agente de diagnóstico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

20. El conjugado de la reivindicación 19, donde el resto heterólogo es un péptido y el conjugado es un péptido de fusión o un péptido quimérico, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

21. El conjugado de la reivindicación 20, que comprende una extensión de 1-21 aminoácidos en el extremo C del aminoácido en la posición 31 del péptido o variante de péptido, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

22. El conjugado de la reivindicación 21, donde la extensión se selecciona del grupo que consiste en: Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 9) o GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 10), o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

23. Un dímero o multímero que comprende un péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, o una sal farmacéuticamente aceptable de este.

24. Una composición farmacéutica que comprende el péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, o una sal farmacéuticamente aceptable de esta; un conjugado de las reivindicaciones 18 a 22, o una sal farmacéuticamente aceptable de este; un dímero o multímero de la reivindicación 23, o una sal farmacéuticamente aceptable de estos; o una combinación de estos, y un portador farmacéuticamente aceptable.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 24 que comprende un agente antidiabético o antiobesidad.

26. Un método para tratar una enfermedad o afección médica en un paciente, donde la enfermedad o afección médica se selecciona del grupo que consiste en: síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa, que comprende administrar al paciente la composición farmacéutica de la reivindicación 24 o 25 en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección médica.

27. El método de la reivindicación 26, que comprende adicionalmente administrar al paciente un agente antidiabético o antiobesidad.

28. El uso del péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, o una sal farmacéuticamente aceptable de este; un conjugado de las reivindicaciones 18 a 22, o una sal farmacéuticamente aceptable de este; un dímero o multímero de la reivindicación 23, o una combinación de estos, para tratar una enfermedad o afección médica.

29. El uso del péptido o variante de péptido de cualquiera de las reivindicaciones que anteceden, o una sal farmacéuticamente aceptable de este; un conjugado de las

reivindicaciones 18 a 22, o una sal farmacéuticamente aceptable de este; un dímero o multímero de la reivindicación 23, o una combinación de estos, en la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad o afección médica.

30. El uso de la reivindicación 28 o 29, donde la enfermedad o afección médica se selecciona del grupo que consiste en: síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática y una enfermedad neurodegenerativa.

(12) SOLICITUD DE PATENTE INTERNACIONAL PUBLICADA CONFORME AL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional
(43) Fecha de Publicación Internacional:
27 de diciembre de 2012 (27-12-2012)

(10) Publicación Internacional Número:
WO 2012/177443 A2

OMPI | PCT

(51) Clasificación Internacional de Patentes
A61K38/26 (2006.01) ***A61P 3/10*** (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) ***A61P 3/04*** (2006.01)
A61K38/16 (2006.01) ***A61P 3/00*** (2006.01)

(21) Solicitud de Patente Internacional Número:
PCT/US2012/042084
(22) Fecha de Presentación Internacional:
12 de junio de 2012 (12-06-2012)
(25) Idioma de presentación: Inglés
(26) Idioma de publicación: Inglés
(30) Datos de la Prioridad:
61/500.027 22 de junio de 2011 (22/06/2011) US
61/547.360 14 de octubre de 2011 (14/10/2011) US

(71) Solicitante *(para todos los Estados designados excepto US):* **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION** [US/US]; 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202 (US)..
(72) Inventor; y
(75) Inventor/Solicitante *(solamente para US):):* **DIMARCHI, Richard, D.** [US/US]; 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033 (US). **SMILEY, David L.** [US/US]; 1013 Sherbrooke Drive, Bloomington, IN 46204 (US).
(74) Agente: **BREEN, John, P.;** Barnes & Thornburg LLP, 11 South Meridian Street, Indianapolis, IN 46204 (US)

(81) Estados Designados *(salvo que se indique de otro modo, para todos los tipos de protección nacional existentes):* AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
(84) Estados Designados *(excepto que se indique de otro modo, para todos los tipos de protección regional existentes):* ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasia (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europeo (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaración Jurada conforme a la Norma 4.17:
-- en cuanto al derecho del solicitante de presentar y una solicitud de patente y a que se le conceda una patente (Norma 4.17(ii)).
-- en cuanto al derecho del solicitante de reivindicar prioridad de la solicitud de patente anterior (Norma 4.17(iii))

Publicada:
-- sin informe de búsqueda internacional y se publicará nuevamente cuando se reciba dicho informe (Norma 48.2(g)).
-- con la parte de listado de secuencias de la memoria descriptiva (Norma 5.2(a)).

(56) Título: COAGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

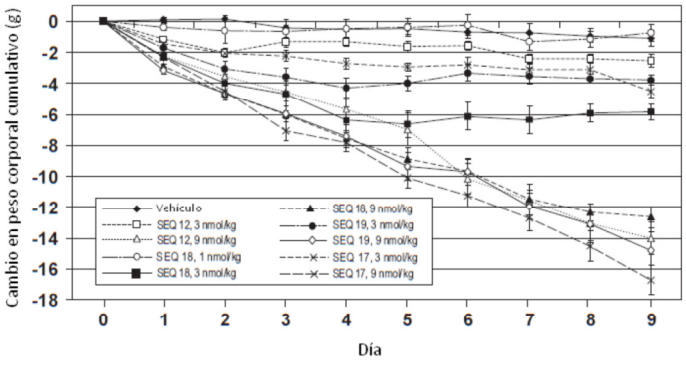


FIG. 1

(57) Resumen de la invención: En la presente se proporcionan péptidos y variantes de péptidos que exhiben una mejora de la actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural.

COAGONISTAS DEL RECEPTOR DE GLUCAGÓN/GLP-1

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES DE PATENTES RELACIONADAS

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/500,027, presentada el 22 de junio de 2011 y la solicitud de patente provisional estadounidense No. 61/547,360, presentada el 14 de octubre de 2012. El contenido de cada una de las solicitudes precedentes se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

INCORPORACIÓN A MODO DE REFERENCIA DEL MATERIAL PRESENTADO POR VÍA ELECTRÓNICA

Se incorpora a modo de referencia en su totalidad un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos de lectura informática, que se presenta junto con la presente y se identifica de la siguiente manera: 15 kilobytes ACII (Texto), título del archivo "07012KL_PCT_Sequence_Listing.txt," creado el 25 de mayo de 2012.

ANTECEDENTES

El pre-proglucagón es un polipéptido precursor de 158 aminoácidos que es procesado en distintos tejidos para formar varios péptidos derivados de proglucagón distintos, incluyendo

glucagón, péptido similar al glucagón 1 (GLP-1), péptido similar al glucagón 2 (GLP-2) y oxintomodulina (OXM), que están involucrados en una gran variedad de funciones fisiológicas, incluyendo la homeostasis de glucosa, la secreción de insulina, el vaciamiento gástrico y el crecimiento intestinal, así como la regulación de la ingesta de alimentos. El glucagón es un péptido de 29 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 33 hasta 61 del pre-proglucagón, mientras que el GLP-1 se produce como un péptido de 37 aminoácidos que corresponde a los aminoácidos 72 hasta 108 del preproglucagón. La amida de GLP-1(7-36) o el ácido de GLP-1(7-37) son formas biológicamente potentes de GLP-1 que demuestran una actividad básicamente equivalente en el receptor de GLP-1.

Durante la hipoglucemia, cuando los niveles de glucosa en sangre disminuyen por debajo de lo normal, el glucagón le indica al hígado que metabolice el glucógeno y libere glucosa, lo que provoca que los niveles de glucosa en sangre aumenten hasta un nivel normal. La hipoglucemia es un efecto secundario común de la terapia con insulina en pacientes con hiperglucemia (niveles elevados de glucosa en sangre) debido a la diabetes. Por lo tanto, la función más reconocida del glucagón en la regulación de la glucosa es contrarrestar la acción de la insulina y mantener los niveles de glucosa en sangre.

El GLP-1 realiza actividades biológicas distintas en comparación con el glucagón. Sus acciones incluyen la estimulación de la síntesis y secreción de la insulina, la inhibición de la secreción del glucagón y la inhibición de la ingesta de alimentos. Se ha demostrado que el GLP-1 reduce la hiperglucemia en diabéticos. El exendina-4, un péptido del veneno del lagarto que comparte alrededor del 50% de identidad de aminoácidos con el GLP-1, activa el receptor del GLP-1 y, asimismo, se ha demostrado que reduce la hiperglucemia en diabéticos.

Asimismo, hay indicios de que el GLP-1 y el exendina-4 puede reducir la ingesta de alimentos y provocar la pérdida de peso, un efecto que sería beneficioso no solamente para diabéticos sino también para pacientes que padecen obesidad. Los pacientes con obesidad tienen un riesgo mayor de padecer diabetes, hipertensión, hiperlipidemia, enfermedad cardiovascular y enfermedades musculoesqueléticas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Las presentes divulgaciones proporcionan péptidos y variantes de péptidos que exhiben actividad en el receptor de glucagón, actividad en el receptor de GLP-1 o actividad en cada uno del receptor de glucagón y del receptor de GLP-1. En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos

que se describen en la presente exhiben una mejora de la actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural. En ejemplos de aspectos, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una selectividad de al menos 100 veces para el receptor de GLP-1 humano en comparación con el receptor GIP.

Las presentes descripciones proporcionan asimismo conjugados que comprenden cualquiera de los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente conjugados a un resto heterólogo. En ejemplos de aspectos, el resto heterólogo es un péptido o una proteína y el conjugado es un péptido de fusión o un péptido quimérico. En ejemplos de aspectos, el resto heterólogo es un polímero, por ej., un polietilenglicol. Las presentes descripciones proporcionan además dímeros y multímeros que comprenden cualquiera de los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente.

Las presentes descripciones proporcionan asimismo composiciones farmacéuticas que comprenden cualquiera de los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente y un portador farmacéuticamente aceptable, así como un método para tratar o prevenir una enfermedad o afección médica (por ej., síndrome metabólico, diabetes, obesidad, esteatosis hepática, una enfermedad neurodegenerativa, hipoglucemia) en un paciente. El método comprende administrar al paciente un

péptido o variante de péptido descrito en la paciente, opcionalmente formulado en una composición farmacéutica, en una cantidad eficaz para tratar la enfermedad o afección médica.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 representa un gráfico del cambio de peso corporal cumulativo (gramos) de ratones DIO tratados con un medio de control o una dosis de un péptido de la SEQ ID NO: 12, 17, 18 o 19, tal como se detalla en el Ejemplo 7.

La Figura 2 representa un gráfico de la glucosa basal (mg/dl) de ratones DIO tratados con un medio de control o una dosis de un péptido de la SEQ ID NO: 12, 17, 18 o 19, tal como se detalla en el Ejemplo 7.

La Figura 3A representa un gráfico del cambio de peso corporal cumulativo (%) de monos rhesus obesos tratados con un medio de control, Liraglutida (Lira), o una dosis de un péptido de la SEQ ID NO: 17 o 20, tal como se detalla en el Ejemplo 8.

La Figura 3B representa un gráfico de la ingesta de alimentos cumulativa (expresada como un porcentaje de la ingesta de alimentos el día 0) de monos rhesus obesos tratados

con un medio de control, Liraglutida, o una dosis de un péptido de la SEQ ID NO: 17 o 20, tal como se detalla en el Ejemplo 8.

La Figura 4 representa un gráfico de los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) de monos rhesus diabéticos tratados con un medio de control o una dosis de un péptido de la SEQ ID NO: 17, tal como se detalla en el Ejemplo 9.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

DEFINICIONES

El término "alrededor de", tal como se usa en la presente, se refiere a más o menos que el valor o intervalo de valores establecidos como el 10 por ciento, pero no pretende designar ningún valor ni intervalo de valores, salvo esta definición general. También se pretende que cada valor o intervalo de valores precedidos por el término "alrededor de" abarque la modalidad del valor absoluto o intervalo de valores establecidos.

Tal como se usa en la presente, el término "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier portador farmacéutico estándar, tal como una solución salina amortiguada con fosfato, agua, emulsiones, tal como una emulsión de aceite/agua o agua/aceite y diversos tipos de agentes humectantes. El término también comprende cualquiera

de los agentes aprobados por un organismo regulador del gobierno federal de los Estados Unidos o enumerados en la farmacopea estadounidense para su uso en animales, incluyendo humanos.

Tal como se usa en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos, que retienen la actividad biológica del compuesto original, y que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Muchos de los compuestos descritos en la presente pueden formar sales ácidas y/o básicas en virtud de la presencia de los grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a estos.

Las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables pueden prepararse a partir de bases inorgánicas y orgánicas. Las sales derivadas de bases inorgánicas incluyen, a modo de ejemplo únicamente, sales de sodio, potasio, litio, amonio, calcio y magnesio. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, de modo no taxativo, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

Tal como se usa en la presente, el término "tratar" incluye la profilaxis del trastorno o afección específico, o el alivio de los síntomas asociados con un trastorno o afección específico y/o prevenir o eliminar dichos síntomas. Por ejemplo, tal como se usa en la presente, el término

"tratar diabetes" se refiere en general a alterar los niveles de glucosa en sangre hacia niveles normales y puede incluir aumentar o disminuir los niveles de glucosa en sangre dependiendo de una situación determinada.

Tal como se usa en la presente, una cantidad "eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" de un péptido de glucagón se refiere a una cantidad del péptido no tóxica pero suficiente para proporcionar el efecto deseado. Por ejemplo, un efecto deseado sería la prevención o tratamiento de la hiperglucemia, por ejemplo, tal como se mide mediante un cambio en el nivel de la glucosa en sangre más cercano a lo normal, o inducir la pérdida de peso/prevenir el aumento de peso, por ej., tal como se mide mediante una reducción en el peso corporal, o prevenir o reducir un aumento en el peso corporal o normalizar la distribución de la grasa corporal. La cantidad que es "eficaz" variará en cada sujeto, dependiendo de la edad y afección general del individuo, del modo de administración y similares. Por consiguiente, no siempre es posible especificar una "cantidad eficaz" exacta. Sin embargo, un experto en la técnica puede determinar una cantidad "eficaz" apropiada en cualquier caso individual usando experimentación de rutina.

El término "parenteral" no se refiere a la administración mediante el canal de alimentación sino a otra vía, por ej., subcutánea, intramuscular, intraespinal o intravenosa.

Tal como se usa en la presente, el término "péptido" abarca una cadena de 3 o más aminoácidos y, en general, menos de 100 aminoácidos, donde los aminoácidos son de origen natural o codificados o aminoácidos de origen no natural o no codificados. Los aminoácidos de origen no natural se refieren a aminoácidos que no tienen origen natural in vivo pero que, sin embargo, se pueden incorporar en las estructuras peptídicas descritas en la presente. "No codificado", tal como se usa en la presente, se refiere a un aminoácido que no es un isómero L de ninguno de los siguientes 20 aminoácidos: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. "Codificado", tal como se usa en la presente, se refiere a un aminoácido que es un isómero L de cualquiera de los siguientes 20 aminoácidos: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente son de alrededor de la misma longitud que la SEQ ID NO: 1 (que es de 29 aminoácidos de longitud), por ej., 25-35 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de longitudes incluyen 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 o 50 aminoácidos de longitud.

En general, los polipéptidos y proteínas tienen una longitud de polímero que es mayor a la de los "péptidos".

A lo largo de la solicitud, todas las referencias a una posición particular de aminoácidos en número (por ej., posición 28) se refieren al aminoácido en dicha posición en el glucagón natural (SEQ ID NO: 1) o a la posición correspondiente de aminoácidos en cualquiera de los análogos de este. Por ejemplo, una referencia en la presente a "posición 28" se refiere a la posición 27 correspondiente para un análogo de glucagón en el cual se ha eliminado el primer aminoácido de la SEQ ID NO: 1. De manera similar, una referencia en la presente a "posición 28" se refiere a la posición 29 correspondiente para un análogo de glucagón en el cual se ha agregado un aminoácido antes del extremo N de la SEQ ID NO: 1. Tal como se usa en la presente, una "modificación de aminoácidos" se refiere a (i) una sustitución o reemplazo de un aminoácido de la SEQ ID NO: 1 con un aminoácido distinto (aminoácido de origen natural o codificado o no codificado o de origen no natural), (ii) una adición de un aminoácido (aminoácido de origen natural o codificado o no codificado o de origen no natural) a la SEQ ID NO: 1 o (iii) una eliminación de uno o más aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

"Identidad porcentual" con respecto a dos secuencias de aminoácidos se refiere a la cantidad de aminoácidos de la

primera secuencia que coincide (es idéntica a) con la cantidad de aminoácidos en la segunda secuencia de referencia, dividida entre la longitud de la secuencia de referencia, cuando las dos secuencias son alineadas para alcanzar una correspondencia máxima (por ej., se pueden introducir huecos para una alineación óptima).

La "modificación" de aminoácidos se refiere a una inserción, eliminación o sustitución de un aminoácido por otro. En algunas modalidades, la sustitución o reemplazo de aminoácidos es una sustitución conservativa de aminoácidos, por ej., una sustitución conservativa del aminoácido en una o más de las posiciones 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29. Tal como se usa en la presente, el término "sustitución conservativa de aminoácidos" es el reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que presenta propiedades similares, por ej., tamaño, carga, hidrofobicidad, hidrofilicidad y/o aromaticidad, e incluye intercambios dentro de uno de los siguientes cinco grupos:

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

Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Residuos polares, con carga negativa y sus amidas y ésteres:

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

III. Residuos polares, con carga positiva:

His, Arg, Lys; Ornitina (Orn)

IV. Residuos grandes, alifáticos, no polares:

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

V. Residuos grandes, aromáticos:

Phe, Tyr, Trp, fenilalanina de acetilo

En algunas modalidades, la sustitución de aminoácidos no es una sustitución conservativa de aminoácidos, por ej., es una sustitución no conservativa de aminoácidos.

Tal como se usa en la presente, el término "aminoácido con carga" o "residuo con carga" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que tiene carga negativa (es decir, desprotonada) o carga positiva (es decir, protonada) en solución acuosa a pH fisiológico. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico y ácido homoglutámico, mientras que los aminoácidos con carga positiva incluyen arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos con carga incluyen los aminoácidos con carga entre los 20 aminoácidos codificados, así como los aminoácidos atípicos o de origen no natural o no codificados.

Tal como se usa en la presente, el término "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido que comprende un segundo resto ácido (aparte del ácido carboxílico del aminoácido),

incluyendo, por ejemplo, un grupo del ácido carboxílico o ácido sulfónico.

Tal como se usa en la presente, el término "aminoácido acilado" se refiere a un aminoácido que comprende un grupo acilo que no es natural con respecto a un aminoácido de origen natural, independientemente del medio mediante el cual se produce (por ej., acilación antes de incorporar el aminoácido en un péptido o acilación luego de la incorporación en un péptido).

Tal como se usa en la presente, el término "aminoácido alquilado" se refiere a un aminoácido que comprende un grupo alquilo que no es natural con respecto a un aminoácido de origen natural, independientemente del medio mediante el cual se produce. Por consiguiente, los aminoácidos acilados y los aminoácidos alquilados de las presentes descripciones son aminoácidos no codificados.

Tal como se usa en la presente, el término "selectividad" de una molécula para un primer receptor con respecto a un segundo receptor se refiere a la siguiente relación: EC50 de la molécula en el segundo receptor dividido entre la EC50 de la molécula en el primer receptor. Por ejemplo, una molécula que tiene una EC50 de 1 nM en un primer receptor y una EC50 de 100 nM en un segundo receptor tiene una selectividad de 100

veces para el primer receptor con respecto al segundo receptor.

Tal como se usa en la presente, el término "glucagón natural" se refiere a un péptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 1 y el término “GLP-1 natural” es un término genérico que designa a la amida de GLP-1(7-36), al ácido de GLP-1(7-37) o una mezcla de esos dos compuestos.

Tal como se usa en la presente, "potencia de glucagón" o "potencia comparada con el glucagón natural" de una molécula se refiere a la relación inversa de la EC50 de la molécula en el receptor de glucagón dividido entre la EC50 del glucagón natural en el receptor de glucagón.

Tal como se usa en la presente, "potencia de GLP-1" o "potencia comparada con el GLP-1 natural" de una molécula se refiere a la relación inversa de la EC50 de la molécula en el receptor de GLP-1 dividido entre la EC50 del GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

MODALIDADES

Las presentes divulgaciones proporcionan péptidos y variantes de péptidos que exhiben actividad en el receptor de GLP-1, en el receptor de glucagón o tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucagón. En este sentido, las

presentes divulgaciones proporcionan péptidos agonistas del receptor de GLP-1, péptidos agonistas del receptor de glucagón y péptidos coagonistas del receptor de GLP-1/glucagón. En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos que se describen en la presente exhiben una mejora de la actividad o mayor potencia en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1). En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos de las presentes descripciones exhiben una mayor potencia en el receptor de GLP-1, en comparación con el GLP-1 humano natural (SEQ ID NO: 2) o una de las formas activas de este (SEQ ID NO: 5 y 6). En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una mayor potencia en el receptor de glucagón, en comparación con el GLP-1 humano natural. En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una mayor potencia en el receptor de glucagón, en comparación con el glucagón humano natural.

En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben otras mejoras en las propiedades con respecto al glucagón natural o al GLP-1 natural, tales como, mayor estabilidad, mayor solubilidad, una semivida prolongada en la circulación, una demora del comienzo de la acción, una prolongación de la duración de la acción, un pico amortiguado (por ej., disminución relativa del pico

promedio de concentración plasmática), y mayor resistencia a las proteasas, tal como DPP-IV.

Los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente están basados en la secuencia de aminoácidos del glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1), y se describen en la presente como "péptidos", "variantes de péptidos", "análogos de glucagón", "análogos", o "péptidos de glucagón". Se entiende que los términos, tales como "análogo", "variante" o "modificaciones" abarcan los péptidos o proteínas sintetizados de cero y no requieren la realización de ningún paso de modificación particular. En algunos aspectos, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos modificados de la SEQ ID NO: 1 que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 modificaciones de aminoácidos con relación a la SEQ ID NO: 1, y en algunos casos, 16 o más (por ej., 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26), modificaciones de aminoácidos, tal como se describe más detalladamente en la presente. La siguiente descripción de los análogos de glucagón y/o péptidos de glucagón, por lo tanto, se aplica a cualquiera de los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente, independientemente del grado de similitud entre el glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1) y el péptido o variante de péptido de las presentes descripciones.

Se contempla que cualquiera de las secuencias de péptidos descritas en la presente pueden variar aun más incorporando modificaciones adicionales de aminoácidos; por ejemplo, incluyendo cualquiera de las modificaciones descritas en la presente, por ej., en las posiciones descritas en la presente, o incorporando sustituciones conservativas o volviendo al aminoácido de glucagón natural (ver SEQ ID NO: 1) en dicha posición. En ejemplos de modalidades, las modificaciones incluyen, por ej., acilación, alquilación, pegilación, truncamiento en el extremo C, sustitución del aminoácido en una o más de las posiciones 1, 2, 3, 7, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28 y 29. Por ejemplo, donde cualquiera de las secuencias de péptidos descritas en la presente incluye un Cys con propósitos de pegilación, una variante de péptido puede usar un aminoácido distinto para la pegilación. Como otro ejemplo, una variante de péptido puede estar pegilada en una posición distinta (por ej., reemplazando el Cys existente con un aminoácido distinto, insertando un nuevo Cys en la posición de pegilación propuesta y pegilando el nuevo Cys). Como un ejemplo adicional, donde cualquiera de las secuencias de péptido descritas en la presente incluye un Lys con propósitos de acilación, el Lys se puede mover en una posición distinta y la nueva posición se acila. En cualquiera de las modalidades descritas en la presente, las variantes de péptidos pueden ser, por ejemplo, 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los péptidos originales en toda la longitud de los péptidos

originales o en los aminoácidos 1–29 del péptido original (por ej., puede incorporar 1, 2, 3, 4 o 5 modificaciones adicionales en comparación con el péptido original).

También se contemplan los conjugados, las proteínas de fusión y los multímeros de cualquiera de las secuencias de péptidos descritos en la presente.

ACTIVIDAD DE LOS PÉPTIDOS Y VARIANTES DE PÉPTIDOS

Actividad agonista en el receptor de glucagón

En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos de la presente descripción exhiben una EC50 en el receptor de glucagón de alrededor de 1000 µM o menos (por ej., alrededor de 750 µM o menos, alrededor de 500 µM o menos, alrededor de 250 µM o menos, alrededor de 100 µM o menos, alrededor de 75 µM o menos, alrededor de 50 µM o menos, alrededor de 25 µM o menos, alrededor de 10 µM o menos, alrededor de 5 µM o menos o alrededor de 1 µM o menos). En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 para la activación del receptor de glucagón que se encuentra en el intervalo nanomolar. Por ejemplo, los péptidos y variantes de péptidos de la presente descripción exhiben una EC50 en el receptor de glucagón que es de alrededor de 1000 nM o menos (por ej., alrededor de 750 nM o menos, alrededor de 500 nM o menos, alrededor de 250 nM o

menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 75 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 25 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 5 nM o menos o alrededor de 1 nM o menos). En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 en el receptor de glucagón que se encuentra en el intervalo picomolar. Por consiguiente, en ejemplos de aspectos, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 para la activación del receptor de glucagón de alrededor de 1000 pM o menos (por ej., alrededor de 750 pM o menos, alrededor de 500 pM o menos, alrededor de 250 pM o menos, alrededor de 100 pM o menos, alrededor de 75 pM o menos, alrededor de 50 pM o menos, alrededor de 25 pM o menos, alrededor de 10 pM o menos, alrededor de 5 pM o menos o alrededor de 1 pM o menos). Se entiende que una EC50 inferior indica una mayor actividad o potencia en el receptor.

En algunas modalidades, los análogos de glucagón descritos en la presente exhiben una EC50 en el receptor de glucagón que es de alrededor de 0.001 pM o más, alrededor de 0.01 pM o más o alrededor de 0.1 pM o más. La activación del receptor de glucagón (actividad del receptor de glucagón) se puede medir mediante ensayos *in vitro* midiendo la inducción de cAMP en células HEK293 que sobreexpresan el receptor de glucagón, por ej., ensayando células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor de glucagón y un gen de

luciferasa ligado al elemento de respuesta de cAMP, tal como se describe en el Ejemplo 2.

En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben alrededor del 0.001% o más, alrededor del 0.01% o más, alrededor del 0.1% o más, alrededor del 0.5% o más, alrededor del 1% o más, alrededor del 5% o más, alrededor del 10% o más, alrededor del 20% o más, alrededor del 30% o más, alrededor del 40% o más, alrededor del 50% o más, alrededor del 60% o más, alrededor del 75% o más, alrededor del 100% o más, alrededor del 125% o más, alrededor del 150% o más, alrededor del 175% o más, alrededor del 200% o más, alrededor del 250% o más, alrededor del 300% o más, alrededor del 350% o más, alrededor del 400% o más, alrededor del 450% o más o alrededor del 500% o más actividad en el receptor de glucagón con respecto al glucagón natural (potencia del glucagón). En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben alrededor del 5000% o menos o alrededor del 10,000% o menos de actividad en el receptor de glucagón con respecto al glucagón natural. La actividad del análogo de glucagón en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de la EC50 para el análogo de glucagón en comparación con ligando natural.

En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben actividad (potencia) considerable solamente en el receptor de glucagón y no exhiben actividad, o muy poca, en el receptor de GLP-1. Por consiguiente, en algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos se consideran como "agonistas puros del receptor de glucagón" o no se consideran como un "coagonista del receptor del glucagón/GLP-1". En algunas modalidades, estos péptidos y variantes de péptidos exhiben cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de glucagón descrito en la presente pero tienen considerablemente menos actividad (potencia) en el receptor de GLP-1. En algunas modalidades, el análogo de glucagón exhibe una EC50 en el receptor de GLP-1 que es 100 veces o más que la EC50 en el receptor de glucagón.

Actividad agonista en el receptor de GLP-1

En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 para la activación del receptor de GLP-1 de alrededor de 1000 µM o menos (por ej., alrededor de 750 µM o menos, alrededor de 500 µM o menos, alrededor de 250 µM o menos, alrededor de 100 µM o menos, alrededor de 75 µM o menos, alrededor de 50 µM o menos, alrededor de 25 µM o menos, alrededor de 10 µM o menos, alrededor de 5 µM o menos o alrededor de 1 µM o menos). En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 en el

receptor de GLP-1 de alrededor de 1000 nM o menos (por ej., alrededor de 750 nM o menos, alrededor de 500 nM o menos, alrededor de 250 nM o menos, alrededor de 100 nM o menos, alrededor de 75 nM o menos, alrededor de 50 nM o menos, alrededor de 25 nM o menos, alrededor de 10 nM o menos, alrededor de 5 nM o menos o alrededor de 1 nM o menos). En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos tienen una EC50 en el receptor de GLP-1 que se encuentra en el intervalo picomolar. Por consiguiente, en algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 para la activación del receptor de GLP-1 de alrededor de 1000 pM o menos (por ej., alrededor de 750 pM o menos, alrededor de 500 pM o menos, alrededor de 250 pM o menos, alrededor de 100 pM o menos, alrededor de 75 pM o menos, alrededor de 50 pM o menos, alrededor de 25 pM o menos, alrededor de 10 pM o menos, alrededor de 5 pM o menos o alrededor de 1 pM o menos). Se entiende que una EC50 inferior indica una mayor actividad o potencia en el receptor.

En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben una EC50 en el receptor de GLP-1 que es de alrededor de 0.001 pM o más, alrededor de 0.01 pM o más o alrededor de 0.1 pM o más. La activación del receptor de GLP-1 (actividad del receptor de GLP-1) se puede medir mediante ensayos *in vitro* midiendo la inducción de cAMP en células HEK293 que sobreexpresan el

receptor de GLP-1, por ej., ensayando células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor de GLP-1 y un gen de luciferasa ligado al elemento de respuesta de cAMP, tal como se describe en el Ejemplo 2.

En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos de las presentes descripciones exhiben alrededor del 0.001% o más, alrededor del 0.01% o más, alrededor del 0.1% o más, alrededor del 0.5% o más, alrededor del 1% o más, alrededor del 5% o más, alrededor del 10% o más, alrededor del 20% o más, alrededor del 30% o más, alrededor del 40% o más, alrededor del 50% o más, alrededor del 60% o más, alrededor del 75% o más, alrededor del 100% o más, alrededor del 125% o más, alrededor del 150% o más, alrededor del 175% o más, alrededor del 200% o más, alrededor del 250% o más, alrededor del 300% o más, alrededor del 350% o más, alrededor del 400% o más, alrededor del 450% o más o alrededor del 500% o más actividad en el receptor de GLP-1 con respecto al GLP-1 natural (potencia del GLP-1). En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben alrededor del 5000% o menos o alrededor del 10,000% o menos de actividad en el receptor de GLP-1 con respecto al GLP-1 natural (potencia de GLP-1).

En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben actividad (potencia) considerable solamente

en el receptor de GLP-1 y no exhiben actividad, o muy poca, en el receptor de glucagón. En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos se consideran como "agonistas puros del receptor de GLP-1" o no se consideran como "coagonistas del receptor del glucagón/GLP-1". En algunas modalidades, estos péptidos y variantes de péptidos exhiben cualquiera de los niveles de actividad o potencia en el receptor de GLP-1 descrito en la presente pero tienen considerablemente menos actividad (potencia) en el receptor de glucagón. En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben una EC50 en el receptor de glucagón que es 100 veces o más que la EC50 en el receptor de GLP-1.

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

En ejemplos de modalidades, los péptidos y variantes de péptidos exhiben actividad tanto en el receptor de GLP-1 como en el receptor de glucagón y se pueden considerar como "coagonistas del receptor de glucagón/GLP-1". En ejemplos de modalidades, la actividad (por ej., la EC50 o la actividad o potencia relativa) de los péptidos y variantes de péptidos en el receptor de glucagón se encuentra dentro de alrededor de 50 veces más, alrededor de 40 veces más, alrededor de 30 veces más, alrededor de 20 veces más, alrededor de 10 veces más o alrededor de 5 veces distinto (superior o inferior) de su

actividad (por ej., la EC50 o la actividad o potencia relativa) en el receptor de GLP-1. En ejemplos de aspectos, la potencia del glucagón del péptido o variante de péptido se encuentra dentro de alrededor de 25, alrededor de 20, alrededor de 15, alrededor de 10 o alrededor de 5 veces distinto (superior o inferior) de su potencia de GLP-1. En ejemplos de aspectos, la potencia del glucagón del péptido o variante de péptido se encuentra dentro de alrededor de 25, alrededor de 20, alrededor de 15, alrededor de 10 o alrededor de 5 veces inferior a su potencia de GLP-1.

En ejemplos de modalidades, el coagonista es aproximadamente equipotente o relativamente más potente en el receptor de GLP-1 que el receptor de glucagón. Por ejemplo, la relación de la actividad relativa de la EC50 o la potencia del péptido o variante de péptido en el receptor de glucagón dividido entre la actividad relativa o la EC50 o potencia del péptido o variante de péptido en el receptor de GLP-1 es inferior a, o es de alrededor de X, donde X se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5. En ejemplos de modalidades, la relación de la EC50 o la potencia o actividad relativa del péptido o variante de péptido en el receptor de glucagón dividido entre la EC50 o la potencia o actividad relativa del péptido o variante de péptido en el receptor de GLP-1 es de alrededor de 1 y menos de 5 (por ej., alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2, alrededor de 1). En

ejemplos de modalidades, la relación de la EC50 o la potencia o actividad relativa del péptido o variante de péptido en el receptor de GLP-1 dividido entre la EC50 o la potencia o actividad relativa del péptido o variante de péptido en el receptor de glucagón es inferior a 5 (por ej., alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2, alrededor de 1). En ejemplos de modalidades, la relación de la potencia del glucagón del péptido o variante de péptido en comparación con la potencia de GLP-1 del péptido o variante de péptido es inferior a, o es de alrededor de Y, donde Y se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En ejemplos de modalidades, la relación de la potencia del glucagón del péptido o variante de péptido en comparación con la potencia de GLP-1 del péptido o variante de péptido es inferior a 5 (por ej., alrededor de 4, alrededor de 3, alrededor de 2, alrededor de 1). En algunas modalidades, el análogo de glucagón tiene una EC50 en el receptor de glucagón que es de 2 a 10 veces (por ej., 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 6 veces, 7 veces, 8 veces, 9 veces, 10 veces) mayor que la EC50 en el receptor de GLP-1.

En ejemplos de modalidades, el péptido es principalmente un agonista de glucagón y es relativamente más potente en el receptor de glucagón que en el receptor de GLP-1 (por ej., el péptido es 5 veces o más potente en el receptor de glucagón en comparación con el receptor de GLP-1). Por ejemplo, la relación de la actividad o potencia relativa o la EC50 del

péptido o variante de péptido en el receptor de GLP-1 dividido entre la actividad o potencia relativa o la EC50 del péptido o variante de péptido en el receptor de glucagón es inferior a, o es de alrededor de V, donde V se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 o 5. En algunas modalidades, la relación de la potencia del GLP-1 del péptido o variante de péptido en comparación con la potencia de glucagón del péptido o variante de péptido es inferior a, o es de alrededor de W, donde W se selecciona de 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10 y 5. En algunas modalidades, el péptido o variante de péptido exhibe al menos 0.1% (por ej., alrededor de 0.5% o más, alrededor de 1% o más, alrededor de 5% o más, alrededor de 10% o más, o más) de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1 (potencia de GLP-1) y exhibe al menos 0.1% (por ej., alrededor de 0.5% o más, alrededor de 1% o más, alrededor de 5% o más, alrededor de 10% o más, o más) de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón (potencia del glucagón).

Actividad en el receptor de GIP

Además de ser activo en el receptor de glucagón y/o en el receptor de GLP-1, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente, en algunos aspectos, exhiben baja actividad agonista en el receptor de GIP. En dichos aspectos, preferentemente dichos péptidos y variantes de péptidos son al

menos 100 veces selectivos para el receptor de GLP-1 con respecto al receptor de GIP.

En otros aspectos, sin embargo, el péptido o variante de péptido exhibe una actividad considerable en el receptor de GIP, por ej., la EC50 del análogo en el receptor de GIP es inferior a alrededor de 50 veces distinto de su EC50 en el receptor de GLP-1, opcionalmente, donde la potencia de GIP del análogo se encuentra dentro de alrededor de 50 veces de la potencia de GLP-1 del análogo. En ejemplos de modalidades, los péptidos exhiben una EC50 para la activación del receptor de GIP de alrededor de 1 µM o menos, o 100 nM o menos, o alrededor de 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 nM o menos. Se entiende que una EC50 inferior indica una mayor actividad o potencia en el receptor. En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben una EC50 en el receptor de GIP que es de alrededor de 0.001 nM, 0.01 nM o 0.1 nM. En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben una EC50 en el receptor de GIP que es de alrededor de 100 nM como máximo. La activación del receptor se puede medir mediante ensayos *in vitro* midiendo la inducción de cAMP en células HEK293 que sobreexpresan el receptor, por ej., ensayando células HEK293 cotransfectadas con ADN que codifica el receptor y un gen de luciferasa ligado al elemento de respuesta de cAMP, tal como se describe en el Ejemplo 2.

En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben actividad al menos alrededor de 0.1%, 1%, 10%, 50%, 100%, 150% o 200% o mayor en el receptor de GIP con respecto al GIP natural (potencia de GIP). En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben, como máximo, 1000%, 10,000%, 100,000% o 1,000,000% de actividad en el receptor de GIP con respecto al GIP natural. La actividad (potencia) de un péptido de glucagón en un receptor con respecto a un ligando natural del receptor se calcula como la relación inversa de EC50 para el péptido en comparación con ligando natural.

Por lo tanto, un aspecto de las presentes descripciones proporciona péptidos y variantes de péptidos que exhiben actividad tanto en el receptor de glucagón como en el receptor de GIP ("coagonistas de glucagón/GIP"). En algunas modalidades, la EC50 del péptido en el receptor de GIP es inferior a alrededor de 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces distinta (superior o inferior) de su EC50 en el receptor de glucagón. En algunas modalidades, la potencia de GIP del péptido es inferior a alrededor de 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10 o 5 veces distinta (superior o inferior) de su potencia de glucagón. En algunas modalidades, la actividad de GLP-1 se redujo considerablemente o destruyó, por ej., mediante una modificación de aminoácidos en la posición 7, una eliminación del extremo C del aminoácido

en el aminoácido en la posición 27 o 28, o una combinación de estas.

En aspectos alternativos de las presentes descripciones, los péptidos y variantes de péptidos de las presentes descripciones exhiben actividad en los receptores de GLP-1 y GIP, pero no exhiben actividad significativa en el receptor de glucagón ("coagonistas de GIP/GLP-1"), por ej., debido a una modificación de aminoácidos de Gln en la posición 3. Por ejemplo, la sustitución en esta posición con un aminoácido ácido, básico o hidrofóbico (ácido glutámico, ornitina, norleucina) reduce la actividad del glucagón. En otros aspectos, los péptidos y variantes de péptidos exhiben actividad en cada uno de los receptores de glucagón, GIP y GLP-1 ("triagonistas de glucagón/GIP/GLP-1"). Por ejemplo, en cualquiera de estos últimos aspectos, la EC50 del péptido en el receptor de GIP es inferior a alrededor de 50 veces, 40 veces, 30 veces o 20 veces distinta (superior o inferior) de su EC50 en el receptor de GLP-1. En algunas modalidades, la potencia de GIP del péptido es inferior a alrededor de 25, 20, 15, 10 o 5 veces más distinta (superior o inferior) de su potencia de GLP-1. En algunas modalidades, estos péptidos tienen alrededor de 10% o menos de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón, por ej., alrededor de 1-10%, o alrededor de 0.1-10% o más de alrededor de 0.1% pero menos de alrededor de 10%.

Actividad de los conjugados

En algunas modalidades, los péptidos y variantes de péptidos descritos en la presente exhiben actividad o potencia en el receptor de glucagón y/o actividad en el receptor de GLP-1 y/o actividad en el receptor de GIP, tal como se describe anteriormente y, cuando el péptido o variante de péptido es parte de un conjugado (por ej., es conjugado a un resto heterólogo, por ej., un resto hidrofílico, por ej., polietilenglicol), el péptido o variante de péptido exhibe una actividad que es inferior (es decir, potencia inferior o EC50 superior) que cuando el péptido o variante de péptido no es parte del conjugado. En algunos aspectos, el péptido o variante de péptido cuando no forma parte de un conjugado exhibe una potencia en el receptor de glucagón y/o en el receptor de GLP-1 que es de alrededor de 10 veces o mayor que la potencia del péptido o variante de péptido cuando forma parte de un conjugado. En algunos aspectos, el péptido o variante de péptido cuando no está conjugado exhibe una potencia en el receptor de glucagón y/o en el receptor de GLP-1 que es de alrededor de 10 veces, alrededor de 15 veces, alrededor de 20 veces, alrededor de 25 veces, alrededor de 30 veces, alrededor de 35 veces, alrededor de 40 veces, alrededor de 45 veces, alrededor de 50 veces, alrededor de 100 veces o incluso más veces la potencia del péptido o variante de péptido cuando está conjugado.

ESTRUCTURA DE LOS ANÁLOGOS DE GLUCAGÓN

Acilación

De acuerdo con algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado (por ej., un aminoácido acilado no codificado (por ej., un aminoácido que comprende un grupo acilo que no es natural con respecto a un aminoácido de origen natural)). El aminoácido acilado, en algunas modalidades, provoca que el análogo de glucagón tenga uno o más de (i) una semivida prolongada en la circulación, (ii) un retraso del comienzo de la acción, (iii) una mayor duración de la acción, (iv) una mejor resistencia a las proteasas, tal como, DPP-IV, y (v) mayor potencia en uno o ambos receptores de GLP-1 y glucagón. Tal como se muestra en la presente, los análogos de glucagón acilados no exhiben una actividad inferior en los receptores de glucagón y GLP-1 en comparación con los análogos de glucagón no acilados correspondientes. Por el contrario, en algunos casos, los análogos de glucagón acilados en realidad exhiben una actividad mayor en los receptores de GLP-1 y glucagón. Por consiguiente, la potencia de los análogos de glucagón acilados es equivalente a las versiones no aciladas de los análogos de glucagón, si no mejor.

De acuerdo con una modalidad, el análogo de glucagón comprende un grupo acilo que está ligado al análogo de glucagón mediante una unión de éster, tioéster o amida para

prolongar la semivida en la circulación y/o retrasar el comienzo y/o extender la duración de la acción y/o mejorar la resistencia a las proteasas, tal como DPP-IV.

La acilación se puede llevar a cabo en cualquier posición dentro del análogo de glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones 1-29, una posición en el extremo C del aminoácido 29 (por ej., el aminoácido en la posición 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, etc., en una posición dentro de una extensión en el extremo C o dentro del extremo C), siempre que se mantenga la actividad del glucagón y/o de GLP-1, o se mejore. Los ejemplos no taxativos incluyen las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16 y 20. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 10, 12 y 16. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16 y 20. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en una o más posiciones 10 y 12. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado en la posición 12. En ejemplos de

modalidades, el análogo de glucagón comprende una extensión en el extremo C y un aminoácido acilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 9, 10, 12, 16, 20 y 37-43 (por ej., 40). En modalidades específicas, la acilación ocurre en la posición 10 del análogo de glucagón y el análogo de glucagón carece de un puente intramolecular, por ej., un puente intramolecular covalente (por ej., un puente de lactama). Dichos análogos de glucagón acilados que no tienen un puente intramolecular demuestran una mejor actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón, en comparación con los análogos no acilados correspondientes que no tienen un puente intramolecular covalente y en comparación con los análogos correspondientes que no tienen un puente intramolecular acilado en una posición distinta de la posición 10. Tal como se muestra en la presente, la acilación en la posición 10 incluso puede transformar un análogo de glucagón que presenta escasa actividad en el receptor de glucagón en un análogo de glucagón que presenta actividad tanto en el receptor de glucagón como de GLP-1. Por consiguiente, la posición en la que ocurre la acilación puede alterar el perfil de actividad total del análogo de glucagón.

En algunas modalidades, los análogos de glucagón están acilados en la misma posición de aminoácidos donde está unido un resto hidrofílico, o en una posición de aminoácidos distinta. Los ejemplos no taxativos incluyen la acilación en

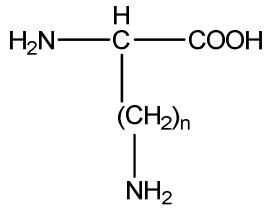
la posición 10 y la pegilación en una o más posiciones en la porción del extremo C del análogo de glucagón, por ej., posición 24, 28 o 29, dentro de una extensión en el extremo C, o en el extremo C (por ej., agregando un Cys en el extremo C).

El grupo acilo se puede unir covalentemente de forma directa al aminoácido del análogo de glucagón o de forma indirecta a un aminoácido del análogo de glucagón mediante un espaciador, donde el espaciador está ubicado entre el aminoácido del análogo de glucagón y el grupo acilo.

En aspectos específicos, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante la acilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón. En algunas modalidades, la acilación está en la posición 10, 20, 24 o 29 del análogo de glucagón. En este sentido, el análogo de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de esta que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente, con al menos uno de los aminoácidos modificados en las posiciones 10, 20, 24 y 29 del análogo a un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral. En algunas modalidades específicas, la acilación directa del análogo de glucagón ocurre a través de

la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral del aminoácido en la posición 10.

En algunas modalidades, el aminoácido que comprende una amina de cadena lateral es un aminoácido de la Fórmula I:

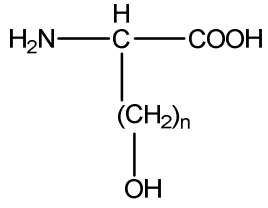


donde n = 1 a 4

[Fórmula I]

En algunos ejemplos de modalidades, el aminoácido de la Fórmula I, es el aminoácido donde n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

En otras modalidades, el aminoácido que comprende un hidroxilo de cadena lateral es un aminoácido de la Fórmula II:

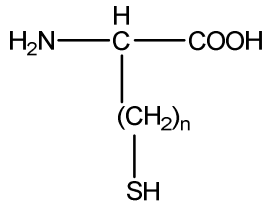


donde n = 1 a 4

[Fórmula II]

En algunos ejemplos de modalidades, el aminoácido de la Fórmula II, es el aminoácido donde n es 1 (Ser).

En aun otras modalidades, el aminoácido que comprende un tiol de cadena lateral es un aminoácido de la Fórmula III:



donde n = 1 a 4

[Fórmula III]

En algunos ejemplos de modalidades, el aminoácido de la Fórmula III, es el aminoácido donde n es 1 (Cys).

En aun otras modalidades, el aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, con la excepción de que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III se reemplaza con una segunda cadena lateral.

En algunas modalidades, el glucagón acilado comprende un espaciador entre el análogo y el grupo acilo. En algunas modalidades, el análogo de glucagón está unido covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo acilo.

En algunas modalidades, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral, o

un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral. El aminoácido al que se encuentra unido el espaciador puede ser cualquier aminoácido (por ej., un aminoácido simple o doblemente sustituido con α) que comprende un resto que permite la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende un NH_2, –OH o –COOH de cadena lateral (por ej., Lys, Orn, Ser, Asp o Glu) es adecuado. En este sentido, el análogo de glucagón acilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o una secuencia de aminoácidos modificada de esta que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente, con al menos uno de los aminoácidos modificados en las posiciones 10, 20, 24 y 29 a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato de cadena lateral.

En algunas modalidades, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral, o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral.

Cuando ocurre la acilación a través de un grupo amina de un espaciador, la acilación puede ocurrir a través de la amina alfa del aminoácido de una amina de cadena lateral. En el caso en que se acila la alfa amina, el aminoácido del espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido del

espaciador puede ser un aminoácido hidrofóbico, por ej., Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico. De manera alternativa, el aminoácido del espaciador puede ser un residuo ácido, por ej., Asp, Glu, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, ácido cisteico, ácido gamma-glutámico.

En el caso en que la amina de cadena lateral del aminoácido del espaciador esté acilada, el aminoácido del espaciador es un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, por ej., un aminoácido de la Fórmula I (por ej., Lys u Orn). En este caso, es posible que tanto la alfa amina como la amina de cadena lateral del aminoácido del espaciador esté acilado, de modo que el análogo de glucagón esté diacilado. Las modalidades de la invención incluyen dichas moléculas diaciladas.

Cuando ocurre la acilación a través de un grupo hidroxilo de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de la Fórmula II. En un ejemplo de modalidad específico, el aminoácido es Ser.

Cuando ocurre la acilación a través de un grupo tiol de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del

dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de la Fórmula III. En un ejemplo de modalidad específico, el aminoácido es Cys.

En algunas modalidades, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrofílico. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende dos o más grupos reactivos, por ej., un grupo amina, hidroxilo, tiol y carboxilo o cualquier combinación de estos. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo tiol y un carboxilato. En una modalidad específica, el espaciador comprende un amino poli(alquiloxi)carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$, donde m es un número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ej., ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está comercialmente disponible en Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

En algunas modalidades, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrofóbico. Los espaciadores bifuncionales hidrofóbicos son conocidos en la técnica. Véase, por ej., *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San

Diego, CA, 1996), que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofóbico comprende dos o más grupos reactivos, por ej., un grupo amina, hidroxilo, tiol y carboxilo o cualquier combinación de estos. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofóbico comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofóbico comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofóbico comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrofóbicos adecuados que comprenden un carboxilato y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxioctanoico y ácido 8-mercaptooctanoico.

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

El espaciador (por ej., aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrofílico o espaciador bifuncional hidrofóbico) en modalidades específicas es de 3 a 10 átomos (por ej., 6 a 10 átomos, (por ej., 6, 7, 8, 9 o 10

átomos) de longitud. En modalidades más específicas, el espaciador es de alrededor de 3 a 10 átomos (por ej., 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo acilo es un grupo acilo graso de C12 a C18, por ej., grupo acilo graso de C14, grupo acilo graso de C16, de modo que la longitud total del espaciador y el grupo acilo es de 14 a 28 átomos, por ej., alrededor de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 átomos. En algunas modalidades, la longitud del espaciador y el grupo acilo es de 17 a 28 (por ej., 19 a 26, 19 a 21) átomos.

De acuerdo con determinadas modalidades precedentes, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen natural (incluyendo, de modo no taxativo, cualquiera de los descritos en la presente) que comprende una estructura de aminoácido que es de 3 a 10 átomos de longitud (por ej., ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico, ácido 8-aminooctanoico). De manera alternativa, el espaciador puede ser un espaciador dipeptídico o tripeptídico que tiene una estructura peptídica que es de 3 a 10 átomos (por ej., 6 a 10 átomos) de longitud. Cada aminoácido del espaciador dipeptídico o tripeptídico puede ser igual al o distinto del otro aminoácido del dipéptido o tripéptido y se puede seleccionar independientemente del grupo que consiste en: aminoácidos de origen natural o codificados y/o no codificados o de origen no natural, incluyendo, por

ejemplo, cualquiera de los isómeros D o L de los aminoácidos de origen natural (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr), o cualquiera de los isómeros D o L de los aminoácidos de origen no natural o no codificados que se se seleccionan del grupo que consiste en: β-alanina (β -Ala), N-α-metil-alanina (Me-Ala), ácido aminobutírico (Abu), ácido γ-aminobutírico (γ-Abu), ácido aminohexanoico (ε-Ahx), ácido aminoisobutírico (Aib), ácido aminometilpirrolo carboxílico, ácido aminopiperidinacarboxílico, aminoserina (Ams), ácido aminotetrahidropiran-4-carboxílico, N-metoxi-N-metil amida de arginina, ácido β-aspártico (β-Asp), ácido carboxílico de azetidina, 3-(2-benzotiazolil)alanina, α-*terc*-butilglicina, ácido 2-amino-5-ureido-n-valérico (citrulina, Cit), β-ciclohexilalanina (Cha), acetamidometil-cisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilalanina (DOPA), dimetiltiazolidina (DMTA), ácido γ-glutámico (γ-Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina (Hyp), isoleucina N-metoxi-N-metil amida, metil-isoleucina (MeIle), ácido isonipecótico (Isn), metil-leucina (MeLeu), metil-lisina, dimetil-lisina, trimetil-lisina, metanoprolina, metionina-sulfóxido (Met(O)), metionina-sulfona (Met(O_2)), norleucina (Nle), metil-norleucina (Me-Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), ácido para-aminobenzoico (PABA), penicilamina (Pen), metilfenilalanina (MePhe), 4-clorofenilalanina (fe(4-Cl)), 4-fluorofenilalanina (fe(4-F)), 4-nitrofenilalanina

(fe(4-NO_2)), 4-cianofenilalanina ((fe(4-CN)), fenilglicina (Phg), piperidinilalanina, piperidinilglicina, 3,4-dehidroprolina, pirrolidinilalanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), O-bencil-fosfoserina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metilheptanoico (Sta), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4,-tetrahidro-isoquinolina-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilalanina (Thi), O-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O-(bis-dimetilamino-fosfono)-tirosina, tirosina sulfato tetrabutilamina, metil-valina (MeVal) y ácido 3-mercaptopropiónico alquilado.

En algunas modalidades, el espaciador comprende una carga negativa total, por ej., comprende uno o dos aminoácidos con carga negativa. En algunas modalidades, el dipéptido no es ninguno de los dipéptidos de la estructura general A-B, donde A se selecciona del grupo que consiste en Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe y Pro, donde B se selecciona del grupo que consiste en Lys, His, Trp. En algunas modalidades, el espaciador dipeptídico se seleccionan del grupo que consiste en: Ala-Ala, β-Ala- β-Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, ácido γ-aminobutírico- ácido γ-aminobutírico, Glu-Glu y γ-Glu- γ-Glu.

En algunos ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante

la acilación de una amina, hidroxilo o tiol de un espaciador, el cual está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24 o 29, o en el aminoácido en el extremo C del análogo de glucagón.

En modalidades aun más específicas, el grupo acilo está unido al aminoácido en la posición 10 del análogo de glucagón y la longitud del espaciador y el grupo acilo es de 14 a 28 átomos. El aminoácido en la posición 10, en algunos aspectos, es un aminoácido de la Fórmula I, por ej., Lys, o un aminoácido disustituido relacionado con la Fórmula I. En modalidades más específicas, el análogo de glucagón carece de un puente intramolecular, por ej., un puente intramolecular covalente. El análogo de glucagón, por ejemplo, puede ser un análogo de glucagón que comprende uno o más aminoácidos alfa, alfa-disustituidos, por ej., AIB, para estabilizar la hélice alfa del análogo.

Los métodos adecuados de acilación de péptidos mediante aminas, hidroxilos y tioles son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el Ejemplo 19 (para encontrar métodos de acilación mediante una amina), Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382 (1996); Shimohigashi y Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982); y Previero et ál., *Biochim Biophys Acta* 263: 7-13 (1972) (para encontrar métodos de acilación mediante un hidroxilo); y San y Silvius, J Pept Res

66: 169-180 (2005) (para encontrar métodos de acilación mediante un tiol); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" páginas 1, 2-12 (1990); Hashimoto et ál., Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Tomo 6, No: 2 pp.171-176 (1989).

El grupo acilo del aminoácido acilado puede ser de cualquier tamaño, por ej., una cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas modalidades específicas, el grupo acilo es un ácido graso de C4 a C30. Por ejemplo, el grupo acilo puede ser cualquiera de: ácido graso de C4, ácido graso de C6, ácido graso de C8, ácido graso de C10, ácido graso de C12, ácido graso de C14, ácido graso de C16, ácido graso de C18, ácido graso de C20, ácido graso de C22, ácido graso de C24, ácido graso de C26, ácido graso de C28 o un ácido graso de C30. En algunas modalidades, el grupo acilo es un ácido graso de C8 a C20, por ej., un ácido graso de C14 o un ácido graso de C16.

En una modalidad alternativa, el grupo acilo es un ácido biliar. El ácido biliar puede ser cualquier ácido biliar adecuado, incluyendo, de modo no taxativo, ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico y ácido colesterol.

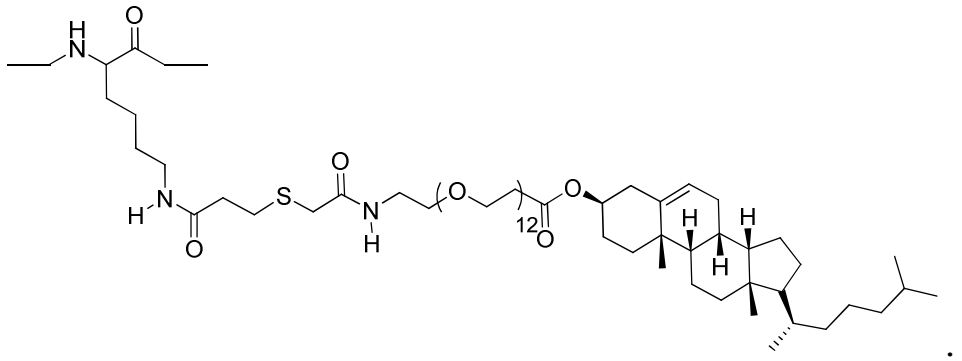
En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado mediante la acilación de un alcano de cadena larga mediante el análogo de glucagón. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo o tiol (por ej., octadecilamina, tetradecanol y hexadecanotiol) que reacciona con un grupo carboxilo, o una forma activada de este, del análogo de glucagón. El grupo carboxilo, o la forma activada de este, del análogo de glucagón puede formar parte de una cadena lateral de un aminoácido (por ej., ácido glutámico, ácido aspártico) del análogo de glucagón o puede formar parte de la estructura del análogo.

En determinadas modalidades, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante la acilación del alcano de cadena larga mediante un espaciador que está unido al análogo de glucagón. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo o tiol que reacciona con un grupo carboxilo, o una forma activada de este, del espaciador. Los espaciadores adecuados que comprenden un grupo carboxilo, o una forma activada de este, se describen en la presente e incluyen, por ejemplo, espaciadores bifuncionales, por ej., aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrofílicos y espaciadores bifuncionales hidrofóbicos.

Tal como se usa en la presente, el término "forma activada de un grupo carboxilo" se refiere a un grupo carboxilo con la fórmula general R(C=O)X, donde X es un grupo saliente y R es el análogo de glucagón o el espaciador. Por ejemplo, las formas activadas de grupos carboxilo pueden incluir, de modo no taxativo, cloruros de acilo, anhídridos y ésteres. En algunas modalidades, el grupo carboxilo activado es un éster con un grupo saliente del éster N-hidroxisuccinimida (NHS).

Con respecto a estos aspectos, en donde un alcano de cadena larga es acilado mediante un análogo de glucagón o el espaciador, el alcano de cadena larga puede tener cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbonos. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En determinados aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano de C4 a C30. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de: un alcano de C4, alcano de C6, alcano de C8, alcano de C10, alcano de C12, alcano de C14, alcano de C16, alcano de C18, alcano de C20, alcano de C22, alcano de C24, alcano de C26, alcano de C28 o un alcano de C30. En algunas modalidades, el alcano de cadena larga comprende un alcano de C8 a C20, por ej., un alcano de C14, alcano de C16 o un alcano de C18.

Además, en algunas modalidades, un grupo amina, hidroxilo o tiol del análogo de glucagón es acilado con un ácido colesterol. En una modalidad específica, el análogo de glucagón está unido al ácido colesterol a través de un espaciador Cys des-amino alquilado, es decir, un espaciador de ácido 3-mercaptopropiónico alquilado. El espaciador Cys des-amino alquilado puede ser, por ejemplo, un espaciador Cys des-amino que comprende un resto dodecaetilenglicol. En una modalidad, el análogo de glucagón comprende la estructura:



.

Los análogos de glucagón acilados descritos en la presente se pueden modificar adicionalmente para comprender un resto hidrofílico. En algunas modalidades específicas, el resto hidrofílico puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un resto hidrofílico se puede lograr a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en la presente. En este sentido, el análogo de glucagón acilado puede comprender la SEQ ID NO: 1, incluyendo cualquiera de las modificaciones descritas en la presente, donde al menos uno de los aminoácidos en la posición 10, 20, 24 y 29 del análogo

comprende un grupo acilo y al menos uno de los aminoácidos en la posición 16, 17, 21, 24 o 29, una posición dentro de la extensión del extremo C, o el aminoácido en el extremo C se convierten en un Cys, Lys, Orn, homo-Cys o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unido covalentemente a un resto hidrofílico (por ej., PEG). En algunas modalidades, el grupo acilo está unido a la posición 10, opcionalmente mediante un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys o Ac-Phe, y el resto hidrofílico se incorpora como un residuo Cys en la posición 24.

De manera alternativa, el análogo de glucagón acilado puede comprender un espaciador, donde el espaciador es acilado y modificado para comprender el resto hidrofílico. Los ejemplos no taxativos de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys y Ac-Phe.

Alquilación

De acuerdo con algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido acilado (por ej., un aminoácido alquilado no codificado (por ej., un aminoácido que comprende un grupo alquilo que no es natural con respecto a un aminoácido de origen natural)). Sin limitarse a ninguna teoría en particular, se considera que la alquilación de los análogos de glucagón alcanzan efectos similares, si no los mismos, que

la acilación de los análogos de glucagón, por ej., prolongar la semivida en la circulación, retrasar el comienzo de la acción, extender la duración de la acción, mejorar la resistencia a las proteasas, tales como DPP-IV y aumentar la potencia en los receptores de GLP-1 y glucagón.

La alquilación se puede llevar a cabo en cualquier posición dentro del análogo de glucagón, incluyendo cualquiera de las posiciones descritas en la presente como un sitio para la acilación, incluyendo, de modo no taxativo, cualquiera de las posiciones de aminoácidos 1-29, una posición en el extremo C del residuo 29, por ej., 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, etc., en una posición dentro de una extensión en el extremo C o dentro del extremo C, siempre que se mantenga la actividad del glucagón o la actividad de GLP-1. Los ejemplos no taxativos incluyen las posiciones 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 o 29. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16 y 20. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 10, 12 y 16. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 9, 10, 12, 16 y 20. En ejemplos de

modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en una o más posiciones 10 y 12. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado en la posición 12. En ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón comprende una extensión en el extremo C y un aminoácido alquilado en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en 9, 10, 12, 16, 20 y 37-43 (por ej., 40). El grupo alquilo se puede unir covalentemente de forma directa al aminoácido del análogo de glucagón o de forma indirecta a un aminoácido del análogo de glucagón mediante un espaciador, donde el espaciador está ubicado entre el aminoácido del análogo de glucagón y el grupo alquilo. El análogo de glucagón puede estar alquilado en la misma posición de aminoácidos donde está unido un resto hidrofílico, o en una posición de aminoácidos distinta. Los ejemplos no taxativos incluyen la alquilación en la posición 10 y la pegilación en una o más posiciones en la porción del extremo C del análogo de glucagón, por ej., posición 24, 28 o 29, dentro de una extensión en el extremo C, o en el extremo C (por ej., agregando un Cys en el extremo C).

En aspectos específicos, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo acilo mediante la alquilación directa de una amina, hidroxilo o tiol de una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón. En algunas modalidades, la alquilación está en la posición 10,

20, 24 o 29 del análogo de glucagón. En este sentido, el análogo de glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, o una secuencia de aminoácidos modificada de esta que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente, con al menos uno de los aminoácidos modificados en las posiciones 10, 20, 24 y 29 a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral. En algunas modalidades específicas, la alquilación directa del análogo de glucagón ocurre a través de la amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral del aminoácido en la posición 10.

En algunas modalidades, el aminoácido que comprende una amina de cadena lateral es un aminoácido de la Fórmula I. En algunos ejemplos de modalidades, el aminoácido de la Fórmula I es el aminoácido donde n es 4 (Lys) o n es 3 (Orn).

En otras modalidades, el aminoácido que comprende un hidroxilo de cadena lateral es un aminoácido de la Fórmula II. En algunos ejemplos de modalidades, el aminoácido de la Fórmula II, es el aminoácido donde n es 1 (Ser).

En aun otras modalidades, el aminoácido que comprende un tiol de cadena lateral es un aminoácido de la Fórmula III. En algunos ejemplos de modalidades, el aminoácido de la Fórmula III, es el aminoácido donde n es 1 (Cys).

En aun otras modalidades, el aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral es un aminoácido disustituido que comprende la misma estructura de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, con la excepción de que el hidrógeno unido al carbono alfa del aminoácido de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III se reemplaza con una segunda cadena lateral.

En algunas modalidades, el análogo de glucagón alquilado comprende un espaciador entre el análogo y el grupo alquilo. En algunas modalidades, el análogo de glucagón está unido covalentemente al espaciador, que está unido covalentemente al grupo alquilo. En algunos ejemplos de modalidades, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo mediante la alquilación de una amina, hidroxilo o tiol de un espaciador, el cual está unido a una cadena lateral de un aminoácido en la posición 10, 20, 24 o 29 del análogo de glucagón. El aminoácido al que se encuentra unido el espaciador puede ser cualquier aminoácido que comprende un resto que permite la unión al espaciador. Por ejemplo, un aminoácido que comprende un NH_2, –OH o –COOH de cadena lateral (por ej., Lys, Orn, Ser, Asp o Glu) es adecuado. En este sentido, el análogo de glucagón alquilado puede comprender la secuencia de aminoácidos modificada de la SEQ ID NO: 1, que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente, con al menos uno de los aminoácidos

modificados en las posiciones 10, 20, 24 y 29 a cualquier aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o carboxilato de cadena lateral.

En algunas modalidades, el espaciador es un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral, o un dipéptido o tripéptido que comprende un aminoácido que comprende una amina, hidroxilo o tiol de cadena lateral.

Cuando ocurre la alquilación a través de un grupo amina de un espaciador, la alquilación puede ocurrir a través de la amina alfa del aminoácido de una amina de cadena lateral. En el caso en que se alquila la alfa amina, el aminoácido del espaciador puede ser cualquier aminoácido. Por ejemplo, el aminoácido del espaciador puede ser un aminoácido hidrofóbico, por ej., Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico. De manera alternativa, el aminoácido del espaciador puede ser un residuo ácido, por ej., Asp y Glu, siempre que la alquilación ocurra en la alfa amina del residuo ácido. En el caso en que la amina de cadena lateral del aminoácido del espaciador esté alquilada, el aminoácido del espaciador es un aminoácido que comprende una amina de cadena lateral, por ej., un aminoácido de la Fórmula I (por ej., Lys u Orn). En este caso, es posible que tanto la alfa amina como la amina de cadena lateral del

aminoácido del espaciador esté alquilada, de modo que el análogo de glucagón esté dialquilado. Las modalidades de la invención incluyen dichas moléculas dialquiladas.

Cuando ocurre la alquilación a través de un grupo hidroxilo de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de la Fórmula II. En un ejemplo de modalidad específico, el aminoácido es Ser.

Cuando ocurre la alquilación a través de un grupo tiol de un espaciador, el aminoácido o uno de los aminoácidos del dipéptido o tripéptido puede ser un aminoácido de la Fórmula III. En un ejemplo de modalidad específico, el aminoácido es Cys.

En algunas modalidades, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrofílico. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende dos o más grupos reactivos, por ej., un grupo amina, hidroxilo, tiol y carboxilo o cualquier combinación de estos. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo tiol y un

carboxilato. En una modalidad específica, el espaciador comprende un amino poli(alquiloxi)carboxilato. En este sentido, el espaciador puede comprender, por ejemplo, $NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$, donde m es un número entero de 1 a 6 y n es cualquier número entero de 2 a 12, tal como, por ej., ácido 8-amino-3,6-dioxaoctanoico, que está comercialmente disponible en Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

En algunas modalidades, el espaciador es un espaciador bifuncional hidrofóbico. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofóbico comprende dos o más grupos reactivos, por ej., un grupo amina, hidroxilo, tiol y carboxilo o cualquier combinación de estos. En determinadas modalidades, el espaciador bifuncional hidrofóbico comprende un grupo hidroxilo y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo amina y un carboxilato. En otras modalidades, el espaciador bifuncional hidrofílico comprende un grupo tiol y un carboxilato. Los espaciadores bifuncionales hidrofóbicos adecuados que comprenden un carboxilato y un grupo hidroxilo o un grupo tiol son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, ácido 8-hidroxioctanoico y ácido 8-mercaptooctanoico.

El espaciador (por ej., aminoácido, dipéptido, tripéptido, espaciador bifuncional hidrofílico o espaciador bifuncional hidrofóbico) en modalidades específicas es de 3 a

10 átomos (por ej., 6 a 10 átomos, (por ej., 6, 7, 8, 9 o 10 átomos) de longitud. En modalidades más específicas, el espaciador es de alrededor de 3 a 10 átomos (por ej., 6 a 10 átomos) de longitud y el grupo acilo es un grupo alquilo de C12 a C18, por ej., grupo alquilo de C14, grupo alquilo de C16, de modo que la longitud total del espaciador y el grupo alquilo es de 14 a 28 átomos, por ej., alrededor de 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 o 28 átomos. En algunas modalidades, la longitud del espaciador y el alquilo es de 17 a 28 (por ej., 19 a 26, 19 a 21) átomos.

De acuerdo con determinadas modalidades precedentes, el espaciador bifuncional puede ser un aminoácido sintético o de origen no natural o no codificado que comprende una estructura de aminoácido que es de 3 a 10 átomos de longitud (por ej., ácido 6-amino hexanoico, ácido 5-aminovalérico, ácido 7-aminoheptanoico y ácido 8-aminooctanoico). De manera alternativa, el espaciador puede ser un espaciador dipeptídico o tripeptídico que tiene una estructura peptídica que es de 3 a 10 átomos (por ej., 6 a 10 átomos) de longitud. El espaciador dipeptídico o tripeptídico puede estar compuesto por aminoácidos de origen natural o codificados y/o no codificados o de origen no natural, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de los aminoácidos indicados en la presente. En algunas modalidades, el espaciador comprende una carga negativa total, por ej., comprende uno o dos aminoácidos con

carga negativa. En algunas modalidades, el espaciador dipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: Ala–Ala, β–Ala– β–Ala, Leu–Leu, Pro–Pro, ácido γ–aminobutírico– ácido γ–aminobutírico y γ–Glu– γ–Glu.

Los métodos adecuados de alquilación de péptidos mediante aminas, hidroxilos y tioles son conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar una síntesis de éteres de Williamson para formar una unión de éteres entre el grupo hidroxilo del análogo de glucagón y el grupo alquilo. Además, una reacción de sustitución nucleofílica del péptido con un haluro de alquilo puede dar como resultado una unión de éter, tioéter o amino.

El grupo alquilo del análogo de glucagón alquilado puede ser de cualquier tamaño, por ej., una cadena de carbono de cualquier longitud, y puede ser lineal o ramificado. En algunas modalidades, el grupo alquilo es un alquilo de C4 a C30. Por ejemplo, el grupo alquilo puede ser cualquiera de: un alquilo de C4, alquilo de C6, alquilo de C8, alquilo de C10, alquilo de C12, alquilo de C14, alquilo de C16, alquilo de C18, alquilo de C20, alquilo de C22, alquilo de C24, alquilo de C26, alquilo de C28 o un alquilo de C30. En algunas modalidades, el grupo alquilo es un alquilo de C8 a C20, por ej., un alquilo de C14 o un alquilo de C16.

En algunas modalidades específicas, el grupo alquilo comprende un resto esteroide de un ácido biliar, por ej., ácido cólico, ácido quenodesoxicólico, ácido desoxicólico, ácido litocólico, ácido taurocólico, ácido glicocólico y ácido colesterol.

En algunas modalidades de la descripción, el análogo de glucagón comprende un aminoácido alquilado haciendo reaccionar un alcano nucleofílico, de cadena larga con el análogo de glucagón, donde el análogo de glucagón comprende un grupo saliente adecuado para la sustitución nucleofílica. En aspectos específicos, el grupo nucleofílico del alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo o tiol (por ej., octadecilamina, tetradecanol y hexadecanotiol). El grupo saliente del análogo de glucagón puede formar parte de una cadena lateral de un aminoácido o puede formar parte de la estructura del péptido. Los grupos salientes adecuados incluyen, por ejemplo, ésteres de N-hidroxisuccinimida, halógenos y sulfonato.

En determinadas modalidades, el análogo de glucagón se modifica para comprender un grupo alquilo haciendo reaccionar el alcano nucleofílico de cadena larga con un espaciador que está unido al análogo de glucagón, donde el espaciador comprende el grupo saliente. En aspectos específicos, el alcano de cadena larga comprende un grupo amina, hidroxilo o

tiol. En determinadas modalidades, el espaciador que comprende el grupo saliente puede ser cualquier espaciador descrito en la presente, por ej., aminoácidos, dipéptidos, tripéptidos, espaciadores bifuncionales hidrofílicos y espaciadores bifuncionales hidrofóbicos que comprenden adicionalmente un grupo saliente adecuado.

Con respecto a estos aspectos de la descripción, en donde un alcano de cadena larga es alquilado mediante el análogo de glucagón o el espaciador, el alcano de cadena larga puede ser de cualquier tamaño y puede comprender cualquier longitud de cadena de carbonos. El alcano de cadena larga puede ser lineal o ramificado. En determinados aspectos, el alcano de cadena larga es un alcano de C4 a C30. Por ejemplo, el alcano de cadena larga puede ser cualquiera de: un alcano de C4, alcano de C6, alcano de C8, alcano de C10, alcano de C12, alcano de C14, alcano de C16, alcano de C18, alcano de C20, alcano de C22, alcano de C24, alcano de C26, alcano de C28 o un alcano de C30. En algunas modalidades, el alcano de cadena larga comprende un alcano de C8 a C20, por ej., un alcano de C14, alcano de C16 o un alcano de C18.

Además, en algunas modalidades, la alquilación puede ocurrir entre el análogo de glucagón y un resto de colesterol. Por ejemplo, el grupo hidroxilo del colesterol puede

reemplazar un grupo saliente en el alcano de cadena larga para formar un producto análogo de colesterol-glucagón.

Los análogos de glucagón alquilados descritos en la presente se pueden modificar adicionalmente para comprender un resto hidrofílico. En algunas modalidades específicas, el resto hidrofílico puede comprender una cadena de polietilenglicol (PEG). La incorporación de un resto hidrofílico se puede lograr a través de cualquier medio adecuado, tal como cualquiera de los métodos descritos en la presente. En este sentido, el análogo de glucagón alquilado puede comprender una SEQ ID NO: 1, que comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente, donde al menos uno de los aminoácidos en la posición 10, 20, 24 y 29 comprende un grupo alquilo y al menos uno de los aminoácidos en la posición 16, 17, 21, 24 y 29, una posición dentro de la extensión del extremo C, o el aminoácido en el extremo C se convierten en un Cys, Lys, Orn, homo-Cys o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unido covalentemente a un resto hidrofílico (por ej., PEG). En algunas modalidades, el grupo alquilo está unido a la posición 10, opcionalmente mediante un espaciador que comprende Cys, Lys, Orn, homo-Cys o Ac-Phe, y el resto hidrofílico se incorpora en un residuo Cys en la posición 24.

De manera alternativa, el análogo de glucagón alquilado puede comprender un espaciador, donde el espaciador es alquilado y modificado para comprender el resto hidrofílico. Los ejemplos no taxativos de espaciadores adecuados incluyen un espaciador que comprende uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Cys, Lys, Orn, homo-Cys y Ac-Phe.

Estabilización de la hélice alfa y los aminoácidos que fomentan la hélice alfa

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, los análogos de glucagón descritos en la presente comprenden una estructura de helicoidal, por ej., una hélice alfa. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende aminoácidos que estabilizan la estructura alfa helicoidal. Por consiguiente, en algunos aspectos, el análogo de glucagón comprende uno o más aminoácidos que fomentan la hélice alfa. Tal como se usa en la presente, el término "aminoácido que fomenta la hélice alfa" se refiere a un aminoácido que proporciona mayor estabilidad a una hélice alfa del análogo de glucagón del que forma parte. Los aminoácidos que fomentan la hélice alfa son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Lyu et ál., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88: 5317-5320 (1991); Branden & Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, Nueva York, NY, 1991; Fasman, *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, ed. Fasman, Plenum,

NY, 1989). Los aminoácidos que fomentan la hélice alfa adecuados a los efectos de la presente incluyen, de modo no taxativo: alanina, norvalina, norleucina, ácido alfa aminobutírico, ácido alfa-aminoisobutírico, leucina, isoleucina, valina y similares. En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa es cualquier aminoácido que forma parte de una hélice alfa que se encuentra en una proteína de origen natural, por ej., Leu, Phe, Ala, Met, Gly, Ile, Ser, Asn, Glu, Asp, Lys, Arg.

En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa proporciona más estabilidad a la hélice alfa en comparación con glicina o alanina. En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa es un aminoácido alfa, alfa disustituido.

Hélice alfa: Posición de los aminoácidos que fomentan la hélice alfa

En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende una secuencia de aminoácidos que es similar al glucagón natural (SEQ ID NO: 1) y el análogo de glucagón comprende al menos un aminoácido que fomenta la hélice alfa. En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa está ubicado en cualquiera de las posiciones 12 a 29 (de acuerdo con la numeración del glucagón natural (SEQ ID NO: 1). En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende una

secuencia de aminoácidos modificada de la SEQ ID NO: 1 y comprende al menos un aminoácido que fomenta la hélice alfa, por ej., en una o más de las posiciones 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido que fomenta la hélice alfa en una, dos, tres o todas de las posiciones 16, 17, 20 y 21.

Hélice alfa: Aminoácidos alfa, alfa disustituidos

En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa es un aminoácido alfa, alfa disustituido. En modalidades específicas, el aminoácido alfa, alfa disustituido comprende R^1 y R^2, cada uno de los cuales está unido al carbono alfa, donde cada uno de R^1 y R^2 se selecciona independientemente del grupo que consiste en alquiloC1–C4, opcionalmente sustituido con hidroxilo, amida, tiol, halo, o R^1 y R^2 junto con el carbono alfa al que están unidos forman un anillo (por ej., un anillo de C3–C8). En algunas modalidades, cada uno de R^1 y R^2 se selecciona del grupo que consiste en: metilo, etilo, propilo y n–butilo, o R^1 y R^2 juntos forman un ciclooctano o cicloheptano (por ej., ácido 1–aminociclooctano–1–carboxílico). En algunas modalidades, R^1 y R^2 son iguales. En algunas modalidades, R^1 es distinto de R^2. En determinados aspectos, cada uno de R^1 y R^2 es un alquiloC1–C4. En algunos aspectos, cada uno de R^1 y R^2 es un alquilo de C1 o C2. En algunas modalidades, cada uno de R^1 y R^2 es metilo, de modo que

el aminoácido alfa, alfa disustituido sea ácido alfa-aminoisobutírico (AIB).

En algunos aspectos, los análogos de glucagón descritos en la presente comprenden uno o más aminoácidos alfa, alfa disustituidos y los análogos de glucagón específicamente carecen de un puente intramolecular covalente (por ej., una lactama), dado que el aminoácido alfa, alfa disustituido puede estabilizar la hélice alfa en ausencia de un puente covalente. En algunos aspectos, el análogo de glucagón comprende uno o más aminoácidos alfa, alfa disustituido en el extremo C (alrededor de las posiciones 12-29). En algunas modalidades, una, dos, tres, cuatro o más de las posiciones 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28 o 29 del análogo de glucagón es sustituida con un aminoácido α, α-disustituido, por ej., ácido amino iso-butírico (AIB), un aminoácido disustituido con el mismo grupo o uno distinto seleccionado de metilo, etilo, propilo y n-butilo, o con ciclooctano o cicloheptano (por ej., ácido 1-aminociclooctano-1-carboxílico). Por ejemplo, la sustitución de la posición 16 con AIB fomenta la actividad de GLP-1, en ausencia de un puente intramolecular, por ej., un puente intramolecular no covalente (por ej., un puente de sal) o un puente intramolecular covalente (por ej., una lactama). En algunas modalidades, una, dos, tres o más de las posiciones 16, 20, 21 o 24 son sustituidas con AIB. En modalidades específicas, uno o ambos aminoácidos que corresponden a las

posiciones 2, 16, del glucagón humano natural (SEQ ID NO: 1) son sustituidos con un aminoácido alfa, alfa disustituido, tal como AIB.

De acuerdo con algunas modalidades, el análogo de glucagón que carece de un puente intramolecular comprende una o más sustituciones dentro de las posiciones de aminoácido 12-29 con un aminoácido α, α,-disustituido y un grupo acilo o alquilo unido covalentemente a la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo de glucagón. En modalidades específicas, el grupo acilo o alquilo no es de origen natural o un aminoácido. En determinados aspectos, el grupo acilo o alquilo no es natural con respecto al aminoácido en la posición 10. Dichos péptidos de glucagón acilados o alquilados que carecen de un puente intramolecular exhiben una mejor actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón en comparación con los péptidos no acilados equivalentes. Se puede lograr una mejora adicional de la actividad en los receptores de GLP-1 y glucagón mediante los péptidos de glucagón acilados que carecen de un puente intramolecular incorporando un espaciador entre el grupo acilo o alquilo y la cadena lateral del aminoácido en la posición 10 del análogo. La acilación y alquilación, incorporando espaciadores o no, se describen adicionalmente en la presente.

Hélice alfa: Puentes intramoleculares

En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa es un aminoácido que está unido a otro aminoácido del análogo de glucagón mediante un puente intramolecular. En dichas modalidades, se considera que cada uno de estos dos aminoácidos unidos mediante un puente intramolecular es un aminoácido que fomenta la hélice alfa. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende uno o dos puentes intramoleculares. En algunas modalidades específicas, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular en combinación con al menos otro aminoácido que fomenta la hélice alfa, por ej., un aminoácido alfa, alfa-disustituido.

En algunas modalidades, el puente intramolecular es un puente que conecta dos partes del análogo de glucagón mediante enlaces no covalentes, incluyendo, por ejemplo, interacciones de van der Waals, enlaces de hidrógeno, enlaces iónicos, interacciones hidrofóbicas, interacciones dipolo-dipolo y similares. En este sentido, el análogo de glucagón en determinados aspectos comprende un puente intramolecular no covalente. En algunas modalidades, el puente intramolecular no covalente es un puente de sal.

En algunas modalidades, el puente intramolecular es un puente que conecta dos partes del análogo mediante enlaces covalentes. En este sentido, el análogo de glucagón en

determinados aspectos comprende un puente intramolecular covalente.

En algunas modalidades, el puente intramolecular (por ej., puente intramolecular no covalente, puente intramolecular covalente) está formado entre dos aminoácidos que están a 3 aminoácidos de distancia, por ej., aminoácidos en las posiciones i e i+4, donde i es cualquier número entero entre 12 y 25 (por ej., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25). Más particularmente, las cadenas laterales de los pares de aminoácidos 12 y 16, 16 y 20 , 20 y 24 o 24 y 28 (pares de aminoácidos donde i = 12, 16, 20 o 24) están unidas entre sí y, por lo tanto, estabilizan la hélice alfa de glucagón. De manera alternativa, i puede ser 17. En algunas modalidades específicas, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular entre los aminoácidos 17 y 21. En algunas modalidades específicas, el análogo de glucagón comprende un puente intramolecular entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 o 12 y 16, y un segundo puente intramolecular entre los aminoácidos en las posiciones 17 y 21. En la presente se contemplan los análogos de glucagón que comprenden uno o más puentes intramoleculares. En modalidades específicas, donde los aminoácidos en las posiciones i e i+4 están unidos mediante un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de alrededor de 8 átomos o alrededor de 7-9 átomos.

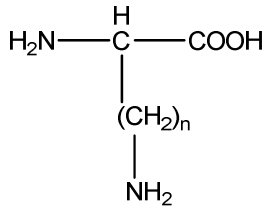
En otras modalidades, el puente intramolecular está formado entre dos aminoácidos que están a dos aminoácidos de distancia, por ej., aminoácidos en las posiciones j y j+3, donde j es cualquier número entero entre 12 y 26 (por ej., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 26). En algunas modalidades específicas, j es 17. En modalidades específicas, donde los aminoácidos en las posiciones j y j+3 están unidos mediante un puente intramolecular, el tamaño del enlazador es de alrededor de 6 átomos o alrededor de 5 a 7 átomos.

En aun otras modalidades, el puente intramolecular está formado entre dos aminoácidos que están a 6 aminoácidos de distancia, por ej., aminoácidos en las posiciones k y k+7, donde k es cualquier número entero entre 12 y 22 (por ej., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21 y 22). En algunas modalidades específicas, k es 12, 13 o 17. En un ejemplo de modalidad, k es 17.

Hélice alfa: Aminoácidos involucrados en los puentes intramoleculares

Los ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden unirse (covalente o no covalentemente) para formar un puente de unión de seis átomos incluyen Orn y Asp, Glu y un aminoácido de la Fórmula I, donde n es 2, y ácido

homoglutámico y un aminoácido de la Fórmula I, donde n es 1, donde la Fórmula I es:



donde n = 1 a 4

[Fórmula I]

Los ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden unirse para formar un puente de unión de siete átomos incluyen Orn–Glu (anillo lactama); Lys–Asp (lactama); o Homoser–Homoglu (lactona). Los ejemplos de emparejamientos de aminoácido que pueden formar un enlazador de ocho átomos incluyen Lys–Glu (lactama); Homolys–Asp (lactama); Orn–Homoglu (lactama); 4–aminoPhe–Asp (lactama); o Tyr–Asp (lactona). Los ejemplos de emparejamientos de aminoácidos que pueden formar un enlazador de nueve átomos incluyen Homolys–Glu (lactama); Lys–Homoglu (lactama); 4–aminoPhe–Glu (lactama); o Tyr–Glu (lactona). Cualquiera de las cadenas laterales en estos aminoácidos pueden sustituirse adicionalmente con grupos químicos adicionales, en la medida en que la estructura tridimensional del hélica alfa no se altere. Un experto en la técnica puede prever emparejamientos alternativos o análogos de aminoácidos alternativos, incluyendo los derivados químicamente modificados, que crearían una estructura de estabilización de tamaño y efecto deseado similares. Por ejemplo, un puente

disulfuro homocisteína-homocisteína tiene 6 átomos de longitud y se puede modificar adicionalmente para proporcionar el efecto deseado.

Incluso sin unión covalente, los emparejamientos de aminoácidos descritos anteriormente (o los emparejamientos similares que puede prever un experto en la técnica) también puede proporcionar estabilidad adicional a la hélice alfa mediante enlaces no covalentes, por ejemplo, mediante la formación de puentes de sal o interacciones de enlace de hidrógeno. Por consiguiente, los puentes de sal pueden estar formados entre: Orn y Glu; Lys y Asp; Homo-serina y Homo-glutamato; Lys y Glu; Asp y Arg; Homo-Lys y Asp; Orn y Homo-Glutamato; 4-aminoPhe y Asp; Tyr y Asp; Homo-Lys y Glu; Lys y Homo-Glu; 4-aminoPhe y Glu; o Tyr y Glu. En algunas modalidades, el análogo comprende un puente de sal entre cualquiera de los siguientes pares de aminoácidos: Orn y Glu; Lys y Asp; Lys y Glu; Asp y Arg; Homo-Lys y Asp; Orn y Homo-Glutamato; Homo-Lys y Glu; y Lys y Homo-Glu. Los puentes de sal pueden estar formados entre otros pares de cadenas laterales con carga opuesta. Véase, por jet., Kallenbach et él., *Role of the Peptide Bond in Protein Structure and Folding*, in The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

En algunas modalidades, el puente intramolecular no covalente es un puente hidrofóbico. De acuerdo con una modalidad, la hélice alfa del análogo se estabiliza mediante la incorporación de aminoácidos hidrofóbicos en las posiciones j y j+3 o i e i+4. Por ejemplo, i puede ser Tyr e i+4 puede ser Val o Leu; i puede ser Phe e i+4 puede ser Met; o i puede ser Phe e i+4 puede ser Ile. Debería entenderse que, a los efectos de la presente, los emparejamientos de aminoácidos que anteceden se pueden invertir, de modo que el aminoácido indicado en la posición i podría ubicarse de manera alternativa en i+4, mientras que el aminoácido en i+4 podría ubicarse en la posición i. También debería entenderse que los emparejamientos de aminoácidos se pueden formar para j y j+3.

Hélice alfa: Puente intramolecular covalente

En algunas modalidades, el puente intramolecular covalente es un anillo de lactama o puente de lactama. El tamaño del anillo de lactama puede variar dependiendo de la longitud de las cadenas laterales de aminoácidos, y en una modalidad, la lactama está formada mediante la unión de las cadenas laterales de una de una ornitina a la cadena lateral de un ácido aspártico. Los puentes de lactama y los métodos para realizarlos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Houston, Jr., et ál., *J Peptide Sci* 1: 274-282 (2004), y el Ejemplo 1 en la presente. En algunas modalidades, el análogo comprende una secuencia modificada de la SEQ ID NO:

1 y un puente de lactama entre i e i+4, donde i es como se define anteriormente en la presente. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende dos puentes de lactama: uno entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 y otro entre los aminoácidos en las posiciones 17 y 21. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende un puente de lactama y un puente de sal. Los ejemplos de modalidades adicionales se describen en la presente en la sección titulada "EJEMPLOS". Los ejemplos de modalidades adicionales incluyen los siguientes emparejamientos, opcionalmente con un puente de lactama: Glu en la posición 12 con Lys en la posición 16; Lys natural en la posición 12 con Glu en la posición 16; Glu en la posición 16 con Lys en la posición 20; Lys en la posición 16 con Glu en la posición 20; Glu en la posición 20 con Lys en la posición 24; Lys en la posición 20 con Glu en la posición 24; Glu en la posición 24 con Lys en la posición 28; Lys en la posición 24 con Glu en la posición 28.

En algunas modalidades, el puente intramolecular covalente es una lactona. Los métodos adecuados para realizar un puente de lactona son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sheehan et ál., *J Am Chem Soc* 95: 875-879 (1973).

En algunos aspectos, la metatesis de olefina se usa para entrecruzar una o dos vueltas de la hélice alfa del análogo usando un sistema de entrecruzamiento de todos los

hidrocarburos. En este ejemplo, el análogo de glucagón comprende aminoácidos α-metilados que tienen cadenas laterales olefínicas de varias longitudes y configuradas con estereoquímica R o S en las posiciones j y j+3 o i e i+4. En algunas modalidades, el lado olefínico comprende $(CH_2)n$, donde n es cualquier número entero entre 1 y 6. En algunas modalidades, n es 3 para una longitud entrecruzada de 8 átomos. En algunas modalidades, n es 2 para una longitud entrecruzada de 6 átomos. En la presente se describe un ejemplo de análogo de glucagón que comprende un entrecruzamiento olefínico como la SEQ ID NO: 17. Los métodos adecuados para formar dichos puentes intramoleculares se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Schafmeister et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000) y Walensky et ál., *Science* 305: 1466-1470 (2004). En modalidades alternativas, el análogo comprende residuos Ser de *O*-alilo ubicados en las vueltas helicoidales adyacentes, que están unidas por puentes mediante una metatesis con cierre de anillo catalizado con rutenio. Dichos procedimientos de entrecruzamiento se describen en, por ejemplo, Blackwell et él., *Angew, Chem., Int. Ed.* 37: 3281-3284 (1998).

En aspectos específicos, el uso del aminoácido no natural de tio-dialanina, lantionina, que ha sido ampliamente adoptado como un peptidomimético de cisteína, se usa para entrecruzar una vuelta de la hélice alfa. Los métodos adecuados de

ciclización basada en lantionina son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Matteucci et ál., *Tetrahedron* Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et ál., *J. Peptide Res.* 51: 432-436 (1998); Polinsky et ál., *J. Med. Chem.* 35: 4185-4194 (1992); Osapay et ál., *J. Med. Chem.* 40: 2241-2251 (1997); Fukase et ál., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65: 2227-2240 (1992); Harpp et ál., *J. Org. Chem.* 36: 73-80 (1971); Goodman y Shao, *Pure Appl. Chem.* 68: 1303-1308 (1996); y Osapay y Goodman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600 (1993).

En algunas modalidades, los enlaces de α, ω-diaminoalcano, por ej., 1,4-diaminopropano y 1,5-diaminopentano) entre dos residuos Glu en las posiciones i e i+7 se usan para estabilizar la hélice alfa del análogo. Dichos enlaces provocan la formación de un puente de 0 átomos o más de longitud, dependiendo de la longitud del enlace de diaminoalcano. Los métodos adecuados para producir los péptidos entrecruzados con dichos enlaces se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Phelan et ál., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997).

En aun otras modalidades, se usa un puente de disulfuro para entrecruzar una o dos vueltas de la hélice alfa del análogo. De manera alternativa, se usa un puente disulfuro modificado en el que uno o ambos átomos de azufre están reemplazados mediante un grupo metileno que da como resultado

una macrociclización isostérica para estabilizar la hélice alfa del análogo. Los métodos adecuados para modificar los péptidos con puentes disulfuro o ciclización basada en azufre se describen en, por ejemplo, Jackson et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 9391–9392 (1991) y Rudinger y Jost, *Experientia* 20: 570–571 (1964).

En aun otras modalidades, la hélice alfa del análogo se estabiliza mediante la unión de un átomo metálico por medio de dos residuos His o un par His y Cys ubicado en j y j+3, o i e i+4. El átomo metálico puede ser, por ejemplo, Ru(III), Cu(II), Zn(II) o Cd(II). Dichos métodos de estabilización de la hélice alfa basada en la unión metálica son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Andrews y Tabor, *Tetrahedron* 55: 11711–11743 (1999); Ghadiri et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1630–1632 (1990); y Ghadiri et ál., *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9063–9064 (1997).

La hélice alfa del análogo, de manera alternativa, puede estabilizarse mediante otros medios de ciclización del péptido, los cuales se describen en Davies, J. Peptide. Sci. 9: 471–501 (2003). La hélice alfa se puede estabilizar mediante la formación de un puente de amida, puente de tioéter, puente de tioéster, puente de urea, puente de carbamato, puente de sulfonamida y similares. Por ejemplo, se puede formar un puente de tioéster entre el extremo C y la

cadena lateral de un residuo Cys. De manera alternativa, se puede formar un tioéster mediante las cadenas laterales de los aminoácidos que tienen un tiol (Cys) y un ácido carboxílico (por ej., Asp, Glu). En otro método, un agente de entrecruzamiento, tal como un ácido dicarboxílico, por ej., ácido subérico (ácido octanodioico), etc. puede introducir un enlace entre dos grupos funcionales de una cadena lateral de aminoácidos, tal como un grupo amino, hidroxilo, tiol y combinaciones de estos.

Péptidos resistentes a DPP-IV

En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende, en las posiciones 1 o 2 o en ambas posiciones 1 y 2, un aminoácido que logra la resistencia del análogo de glucagón a la escisión de dipeptidil dipeptidasa IV (DPP IV). En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende, en la posición 1, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: D-histidina, desaminohistidina, hidroxil-histidina, acetil-histidina, homo-histidina, N-metil histidina, alfa-metil histidina, ácido acético de imidazol o ácido acético de alfa, alfa-dimetil imidazol (DMIA). En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende, en la posición 2, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en: D-serina, D-alanina, valina, glicina, N-metil serina, N-metil alanina o ácido alfa aminoisobutírico. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende, en la posición 2, un aminoácido que logra

la resistencia del análogo de glucagón a DPP IV y el aminoácido que logra la resistencia del análogo de glucagón a DPP IV no es D-serina.

En algunos aspectos, el análogo de glucagón que comprende un aminoácido que logra la resistencia del análogo de glucagón a DPP IV comprende adicionalmente una modificación de aminoácido que estabiliza la hélice alfa que se encuentra en la porción del extremo C del glucagón, por ej., mediante un enlace covalente entre los aminoácidos en las posiciones "i" e "i+4", por ej., 12 y 16, 16 y 20 o 20 y 24. En algunas modalidades, este enlace covalente es un puente de lactama entre un ácido glutámico en la posición 16 y una lisina en la posición 20. En algunas modalidades, este enlace covalente es un puente intramolecular distinto de un puente de lactama. Por ejemplo, los métodos de unión covalente adecuados incluyen cualquiera de uno o más de metatesis de olefina, ciclización basada en lantionina, formación de puente disulfuro o puente que contiene un azufre modificado, el uso de enlaces de α, ω-diaminoalcano, la formación de puentes de átomos metálicos y otros medios de ciclización de péptidos.

Modificación de la posición 1

En algunas modalidades específicas, el análogo de glucagón comprende (a) una sustitución de aminoácidos de His en la posición 1 con un aminoácido grande, aromático y (b) un

puente intramolecular que estabiliza la hélice alfa en la porción del extremo C de la molécula (por ej., alrededor de las posiciones 12-29). En modalidades específicas, el aminoácido en la posición 1 se reemplaza con Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, cloro-Phe, sulfo-Phe, 4-piridil-Ala, metil-Tyr o 3-amino Tyr. El puente intramolecular, en algunas modalidades, es cualquiera de los que se describen en la presente. En algunos aspectos, el puente intramolecular se encuentra entre las cadenas laterales de dos aminoácidos que están separados por tres aminoácidos, es decir, entre las cadenas laterales de los aminoácidos i e i+4. En algunas modalidades, el puente intramolecular es un puente de lactama. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende un aminoácido grande, aromático en la posición 1 y un puente de lactama entre los aminoácidos en las posiciones 16 y 20 del análogo. Dicho análogo de glucagón, en algunos aspectos, comprende adicionalmente una o más (por ej., dos, tres, cuatro, cinco o más) de las otras modificaciones descritas en la presente. Por ejemplo, el análogo de glucagón puede comprender una amida en lugar del carboxilato del extremo C. Además, en algunas modalidades, dichos análogos de glucagón comprenden adicionalmente uno o más de un aminoácido grande alifático en la posición 17, un imidazol que contiene un aminoácido en la posición 18 y un aminoácido con carga positiva en la posición 19. En algunas modalidades, los análogos de glucagón que comprenden una modificación en la

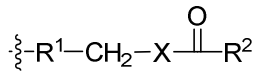
posición 1 y un puente intramolecular comprende adicionalmente la secuencia de aminoácidos Ile-His-Gln en las posiciones 17-19. Dichas modificaciones se pueden realizar sin destruir la actividad del análogo de glucagón en el receptor de GLP-1 y del receptor de glucagón. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende adicionalmente un residuo de aminoácido acilado o alquilado.

Modificación de la posición 3

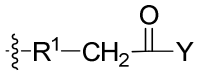
En algunas modalidades, el tercer aminoácido de la SEQ ID NO: 1 (Gln3) es sustituido con un residuo de aminoácido ácido, básico o hidrofóbico, y dicha modificación provoca que se reduzca la actividad del receptor de glucagón. En algunas modalidades, el aminoácido ácido, básico o hidrofóbico es ácido glutámico, ornitina, norleucina. En algunos aspectos, la modificación con uno de estos residuos ha provocado que el análogo de glucagón exhiba una actividad del receptor de glucagón considerablemente reducida o destruida. Los análogos de glucagón que se sustituyen con, por ejemplo, ácido glutámico, ornitina o norleucina, en algunos aspectos, presentan alrededor del 10% o menos de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón, por ej., alrededor del 1-10% o alrededor del 0.1-10% o más de alrededor del 0.1% pero menos de alrededor del 10%, mientras que exhiben al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1. En algunas modalidades, los análogos de glucagón exhiben

alrededor del 0.5%, alrededor del 1% o alrededor del 7% de la actividad del glucagón natural, mientras que exhiben al menos 20% de la actividad de GLP-1 en el receptor de GLP-1.

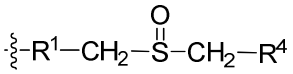
En algunas modalidades, la glutamina en la posición 3 de la SEQ ID NO: 1 del análogo de glucagón se sustituye con un análogo de glutamina sin una pérdida sustancial de actividad en el receptor de glucagón y, en algunos casos, con una mejora de la actividad del receptor de glucagón. En algunas modalidades, el análogo de glutamina es un aminoácido de origen natural o de origen no natural o no codificado que comprende una cadena lateral de la Estructura I, II o III:



Estructura I



Estructura II



Estructura III

donde R^1 es alquiloC$_{0-3}$ o heteroalquiloC$_{0-3}$; R^2 es NHR^4 o alquiloC$_{1-3}$; R^3 es alquiloC$_{1-3}$; R^4 es H o alquiloC$_{1-3}$; X es NH, O o S; e Y es NHR^4, SR^3 o OR^3. En algunas modalidades, X es NH o Y es NHR^4. En algunas modalidades, R^1 es alquiloC$_{0-2}$ o heteroalquiloC$_1$. En algunas modalidades, R^2 es NHR^4 o alquiloC$_1$. En algunas modalidades, R^4 es H o alquiloC$_1$. En ejemplos de

modalidades, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura I donde, R^1 es CH_2–S, X es NH y R^2 es CH_3 (acetamidometil–cisteína, C(Acm)); R^1 es CH_2, X es NH y R^2 es CH_3 (ácido acetildiaminobutanoico, Dab(Ac)); R^1 es C_0 alquilo, X es NH, R^2 es NHR^4 y R^4 es H (ácido carbamoildiaminopropanoico, Dap(urea)); o R^1 es CH_2–CH_2, X es NH, y R^2 es CH_3 (acetilornitina, Orn(Ac)). En ejemplos de modalidades, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura II donde, R^1 es CH_2, Y es NHR^4 y R^4 es CH_3 (metilglutamina, Q(Me)); En ejemplos de modalidades, se proporciona un aminoácido que comprende una cadena lateral de la Estructura III donde, R^1 es CH_2 y R^4 es H (metionina–sulfóxido, M(O)); En modalidades específicas, el aminoácido en la posición 3 es sustituido con Dab(Ac). Por ejemplo, los agonistas de glucagón pueden comprender una secuencia de aminoácidos modificada de la SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 601, SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604, SEQ ID NO: 605 y la SEQ ID NO: 606 del listado de secuencias de la solicitud internacional de patente No. PCT/US2009/047438, presentada el 16 de junio de 2009, que se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad, donde estas secuencias de aminoácidos se modifican tal como se describe adicionalmente en la presente, por ej., se modifican para comprender al menos tres aminoácidos que fomentan la hélice alfa, se modifican para comprender (i) un aminoácido acilado o alquilado en la posición 10, (ii) un aminoácido que fomenta la hélice alfa en

la posición 16, (iii) un aminoácido alifático en la posición 17 y/o 18, y (iv) al menos un aminoácido con carga ubicado en el extremo C de la posición 27 y, opcionalmente, modificaciones adicionales; se modifican para comprender al menos tres aminoácidos de los aminoácidos 18-24 de Exendina-4 (SEQ ID NO: 8) en las posiciones correspondientes del análogo de glucagón.

Modificación de la posición 7

En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada con una modificación de aminoácido en la posición 7. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 7 de la SEQ ID NO: 1 (Thr) se sustituye con un aminoácido grande, alifático, por ej., Ile, Leu, Ala y similares. Se considera que dichas modificaciones reducen de manera drástica la actividad del receptor de GLP-1 del análogo de glucagón.

Modificación de la posición 15

En algunas modalidades, los análogos de glucagón comprenden una SEQ ID NO: 1 modificada con una modificación de aminoácido en la posición 15 que mejora la estabilidad. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 15 de la SEQ ID NO: 1 se elimina o sustituye con ácido glutámico, ácido homoglutámico, ácido cisteico o ácido homocisteico. Dichas modificaciones reducen la degradación o escisión del análogo

con el transcurso del tiempo, especialmente en amortiguadores ácidos o alcalinos, por ej., amortiguadores en un pH dentro del intervalo de 5.5 a 8. En algunas modalidades, los análogos de glucagón que comprenden esta modificación conservan al menos el 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% del análogo original luego de las 24 horas a 25°C.

Modificación de la posición 16

De acuerdo con una modalidad, se proporcionan análogos de glucagón que tienen una mejor potencia y opcionalmente mejoran la solubilidad y estabilidad. En una modalidad, se proporciona una mejor potencia del glucagón y GLP-1 mediante una modificación de aminoácidos en la posición 16 del glucagón natural (SEQ ID NO: 1). A modo de ejemplo no taxativo, dicha mejora en la potencia se puede proporcionar sustituyendo la serina de origen natural en la posición 16 con ácido glutámico o con otro aminoácido con carga negativa que tiene una cadena lateral con una longitud de 4 átomos o, de manera alternativa, con uno de glutamina, ácido homoglutámico o ácido homocisteico, o un aminoácido con carga que tiene una cadena lateral que contiene al menos un heteroátomo (por ej., N, O, S, P) y con una longitud de cadena lateral de alrededor de 4 (o 3-5) átomos. En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada que comprende una sustitución del Ser en la posición 16 con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico,

glutamina, ácido homoglutámico, ácido homocisteico, treonina o glicina. En algunos aspectos, el residuo de serina en la posición 16 se sustituye con un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en ácido glutámico, glutamina, ácido homoglutámico y ácido homocisteico. En algunos aspectos específicos, el residuo de serina en la posición 16 se sustituye con ácido glutámico o una sustitución conservativa de este (por ej., un ácido Exendina-4 amino).

En modalidades alternativas, el análogo de glucagón comprende una secuencia modificada de la SEQ ID NO: 1 modificada por la sustitución de Ser en la posición 16 con Thr o AIB u otro aminoácido que fomenta la hélice alfa, tal como se describe anteriormente. En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en j+3 o i+4.

Modificación en las posiciones 17-18

En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada en la que se elimina el sitio Arg-Arg dibásico en las posiciones 17 y 18. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, se considera que la eliminación del sitio dibásico en algunas modalidades mejora la eficacia in vivo del análogo de glucagón. En algunos aspectos, el análogo de glucagón se modifica en este sentido sustituyendo uno o ambos de los aminoácidos en las posiciones 17 y 18 de la

SEQ ID NO: 1 con un aminoácido que no es básico, por ej., con un aminoácido alifático. En algunas modalidades, se elimina uno de los aminoácidos en la posición 17 o 18 o se inserta un aminoácido entre las posiciones 17 y 18. En algunas modalidades, el Arg en la posición 17 se sustituye con otro aminoácido, tal como se describe en la presente, por ej., Gln, un aminoácido que comprende un resto hidrofílico, un aminoácido que fomenta la hélice alfa. En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en j+3 o i+4. En algunas modalidades, el Arg en la posición 18 se sustituye con otro aminoácido, tal como se describe en la presente. En ejemplos de aspectos, el aminoácido en la posición 18 es un aminoácido alfa, alfa disustituido, por ej., AIB. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 18 es un aminoácido alifático pequeño, por ej., Ala. En algunos aspectos específicos, el aminoácido en la posición 18 es un aminoácido alifático pequeño, por ej., Ala, y el Arg en la posición 17 se mantiene sin modificación.

Modificación de la posición 20

También se proporciona una mejora de la actividad en el receptor de GLP-1 mediante una modificación de aminoácidos en la posición 20. En algunas modalidades, la glutamina en la posición 20 se reemplaza con un aminoácido que fomenta la hélice alfa, por ej., AIB, tal como se describe anteriormente.

En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en j-3 o i-4. En algunas modalidades específicas, el aminoácido es un aminoácido hidrofílico que tiene una cadena lateral que tiene carga o tiene la capacidad de unirse a hidrógeno, y es de al menos alrededor de 5 (o alrededor de 4-6) átomos de longitud, por ejemplo, lisina, citrulina, arginina u ornitina y, opcionalmente, forma un puente de sal con otro aminoácido que fomenta la hélice alfa en la posición 16, por ej., un aminoácido con carga negativa. Dichas modificaciones, en algunos aspectos en particular, reducen la degradación que ocurre mediante la desamidación de Gln y, en algunas modalidades, aumentan la actividad del análogo de glucagón en el receptor de GLP-1. En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 20 es Glu o Lys o AIB.

Modificación en las posiciones 21, 23, 24 y 28

En algunas modalidades, la posición 21 y/o la posición 24 se modifica mediante la sustitución con un aminoácido que fomenta la hélice alfa. En algunas modalidades, el aminoácido que fomenta la hélice alfa forma un puente intramolecular no covalente con un aminoácido en j-3 o i-4. En algunos aspectos, el aminoácido que fomenta la hélice alfa es AIB.

En ejemplos de modalidades, el aminoácido en la posición 23 es un Ile.

En ejemplos de aspectos, el aminoácido en la posición 28 es un aminoácido alfa, alfa disustituido, por ej., AIB.

Extremo C con carga

En algunas modalidades, el análogo de glucagón se modifica mediante sustituciones y/o adicionales de aminoácidos que introducen un aminoácido con carga en la porción del extremo C del análogo. En algunas modalidades, dichas modificaciones mejoran la estabilidad y solubilidad. Tal como se usa en la presente, el término "aminoácido con carga" o "residuo con carga" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que tiene carga negativa (es decir, desprotonada) o carga positiva (es decir, protonada) en solución acuosa a pH fisiológico. En algunos aspectos, estas sustituciones y/o adiciones de aminoácidos que introducen modificaciones de un aminoácido con carga se encuentran en una posición del extremo C de la posición 27 de la SEQ ID NO: 1. En algunas modalidades, uno, dos o tres (y, en algunos casos, más de tres) aminoácidos con carga se introducen en la porción del extremo C (por ej., posiciones del extremo C de la posición 27). De acuerdo con algunas modalidades, los aminoácidos naturales en las posiciones 28 y/o 29 se sustituyen con aminoácidos con carga y/o, en una modalidad adicional, también se agregan uno a tres aminoácidos con carga en el extremo C del análogo. En ejemplos de modalidades, uno,

dos o todos los aminoácidos con carga tienen carga negativa. El aminoácido con carga negativa en algunas modalidades es ácido aspártico, ácido glutámico, ácido cisteico, ácido homocisteico o ácido homoglutámico. En algunos aspectos, estas modificaciones aumentan la solubilidad, por ej., proporcionan al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 15 veces, 25 veces, 30 veces o más solubilidad con respecto al glucagón natural a un pH determinado entre alrededor de 5.5 y 8, por ej., pH 7, cuando se mide luego de las 24 horas a 25°C.

Truncamiento del extremo C

De acuerdo con algunas modalidades, los análogos de glucagón descritos en la presente se modifican mediante el truncamiento del extremo C mediante uno o dos residuos de aminoácidos. Dichos péptidos de glucagón modificados, tal como se muestra en la presente, conservan una actividad y potencia similar en el receptor de glucagón y en el receptor de GLP-1. En este sentido, los péptidos de glucagón pueden comprender los aminoácidos 1-27 o 1-28 del análogo de glucagón natural (SEQ ID NO: 1), opcionalmente con cualquiera de las modificaciones adicionales descritas en la presente.

Extremo C de carga neutra

En algunas modalidades, el análogo de glucagón comprende una SEQ ID NO: 1 modificada donde el ácido carboxílico del aminoácido del extremo C se reemplaza con un grupo de carga

neutra, tal como una amida o un éster. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, dichas modificaciones, en determinados aspectos, aumentan la actividad del análogo de glucagón en el receptor de GLP-1. Por consiguiente, en algunas modalidades, el análogo de glucagón es un péptido amidado, de modo que el residuo del extremo C comprenda una amida en lugar del carboxilato alfa de un aminoácido. Tal como se usa en la presente, una referencia general a un péptido o análogo pretende abarcar los péptidos que tienen un extremo amino, extremo carboxi o ambos extremos amino y carboxi modificados. Por ejemplo, se pretende que una cadena de aminoácidos que comprende un grupo amida en lugar del ácido carboxílico terminal esté comprendida en una secuencia de aminoácidos que designe los aminoácidos estándar.

Otras modificaciones

En algunas modalidades, los análogos de glucagón comprenden adicional o alternativamente las siguientes modificaciones de aminoácidos:

(i) Sustitución de Ser en la posición 2 con Ala;

(ii) Sustitución de Tyr en la posición 10 con Val o Phe o Trp;

(iii) Sustitución de Lys en la posición 12 con Arg;

(iv) Sustitución de Arg en la posición 17 con Gln o un aminoácido alifático pequeño, por ej., Ala, o un aminoácido alifático grande, por ej., Ile;

(v) Sustitución de Arg en la posición 18 con un aminoácido alifático pequeño, por ej., Ala, o un aminoácido que contiene imidazol, por ej., His;

(vi) Sustitución de Ala en la posición 19 con un aminoácido con carga positiva, por ej., Gln;

(vii) Sustitución de Val en la posición 23 con Ile, y

(viii) Sustitución de Thr en la posición 29 con Gly o Gln.

En algunas modalidades, se aumenta la estabilidad del análogo de glucagón mediante la modificación de la metionina en la posición 27, por ejemplo, mediante la sustitución con leucina o norleucina. Dichas modificaciones pueden reducir la degradación oxidativa. La estabilidad también se puede aumentar mediante la modificación del Gln en la posición 20, 24 o 28, por ej., mediante la sustitución de Ala, Ser, Thr o AIB. Dichas modificaciones pueden reducir la degradación que ocurre a través de la desamidación de Gln. Se puede aumentar la estabilidad mediante la modificación de Asp en la posición 21, por ej., mediante la sustitución con otro residuo ácido, por ej., Glu. Dichas modificaciones pueden reducir la degradación que ocurre a través de la deshidratación de Asp para formar un intermedio de succinimida cíclico seguido de la isomerización de iso-aspartato.

En algunas modalidades, los análogos de glucagón descritos en la presente son glicosilados, amidados,

carboxilados, fosforilados, esterificados, N-acilados, ciclizados mediante, por ej., un puente disulfuro, o convertidos en una sal (por ej., una sal de adición de ácidos, una sal de adición de bases), y/u opcionalmente dimerizados, multimerizados o polimerizados o conjugados.

Se pueden aplicar cualquiera de las modificaciones descritas en la presente, incluyendo, por ejemplo, las modificaciones que aumentan o disminuyen la actividad del receptor de glucagón y que aumentan la actividad del receptor de GLP-1, de forma individual o conjunta. Las combinaciones de las modificaciones que aumentan la actividad del receptor de GLP-1 pueden proporcionar una mayor actividad de GLP-1 que cualquiera de dichas modificaciones por sí solas.

EJEMPLOS DE MODALIDADES

Las presentes descripciones proporcionan péptidos que comprenden una estructura similar a la del glucagón humano natural y que exhiben una mejor actividad agonista en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón humano natural. Normalmente, el glucagón tiene alrededor de 1% de la actividad de GLP-1 natural en el receptor de GLP-1, mientras que el GLP-1 normalmente tiene menos de alrededor de 0.01% de la actividad del glucagón natural en el receptor de glucagón. Por consiguiente, los péptidos de las presentes descripciones exhiben más de 1% de la actividad del GLP-1 natural en el

receptor de GLP-1. En ejemplos de modalidades, los péptidos de las presentes descripciones exhiben alrededor de 5% o más, alrededor de 10% o más, alrededor de 15% o más, alrededor de 20% o más, alrededor de 25% o más, alrededor de 30% o más, alrededor de 35% o más, alrededor de 40% o más, alrededor de 45% o más, alrededor de 50% o más, alrededor de 55% o más, alrededor de 60% o más, alrededor de 65% o más, alrededor de 70% o más, alrededor de 75% o más, alrededor de 80% o más, alrededor de 85% o más, alrededor de 90% o más o alrededor de 95% o más de la actividad del GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En ejemplos de aspectos, los péptidos de las presentes descripciones exhiben actividad en el receptor de GLP-1 que es mayor a la del GLP-1 natural. Por consiguiente, en ejemplos de aspectos, los péptidos de las presentes descripciones exhiben alrededor de 100% o más de la actividad del GLP-1 natural en el receptor de GLP-1. En ejemplos de aspectos, los péptidos de las presentes descripciones exhiben alrededor de 150% o más, alrededor de 200% o más, alrededor de 250% o más, alrededor de 300% o más, alrededor de 350% o más, alrededor de 400% o más, alrededor de 450% o más, alrededor de 500% o más, alrededor de 550% o más, alrededor de 600% o más, alrededor de 650% o más, alrededor de 700% o más, alrededor de 750% o más, alrededor de 800% o más, alrededor de 850% o más, alrededor de 900% o más, alrededor de 950% o más o alrededor de 1000% o más de la actividad del GLP-1 natural en el receptor de GLP-1.

En ejemplos de modalidades, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En ejemplos de modalidades, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En ejemplos de modalidades, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En ejemplos de modalidades, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En ejemplos de modalidades, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 16 y exhibe una selectividad de al menos 100 veces para el receptor de GLP-1 humano en comparación con el receptor GIP.

En ejemplos de modalidades, el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 17.

Las presentes descripciones proporcionan adicionalmente variantes de péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos que es muy similar a la secuencia de aminoácidos de uno de los péptidos descritos en la presente. En ejemplos de modalidades, la variante de péptido de las presentes descripciones comprende una secuencia de aminoácidos que es al

menos 80%, 85%, 90% o 95% idéntica a los aminoácidos 1–29 de la secuencia de aminoácidos del péptido de cualquiera de las SEQ ID NO: 12–17, donde la variante de péptido conserva la actividad del péptido original en el receptor de GLP–1, el receptor de glucagón y el receptor de GIP (por ej., exhibe una selectividad de al menos 100 veces más para el receptor de GLP–1 humano en comparación con el receptor de GIP), y opcionalmente una potencia de GLP–1 de al menos 1%; o donde la EC50 del péptido en el receptor de GIP es menos de 100 veces diferente de su EC50 en el receptor de GLP–1). En ejemplos de modalidades, la variante de péptido de las presentes descripciones exhibe una selectividad de al menos 100 veces más para el receptor de GLP–1 humano en comparación con el receptor de GIP.

En ejemplos de modalidades, la variante de péptido de las presentes descripciones comprende una secuencia de aminoácidos basada en una secuencia de aminoácidos de un péptido de las presentes descripciones pero difiere en una o más posiciones de aminoácidos, incluyendo, de modo no taxativo, la posición 1, posición 2, posición 3, posición 7, posición 10, posición 12, posición 15, posición 16, posición 17, posición 18, posición 20, posición 21, posición 23, posición 24, posición 27, posición 28, posición 29. En ejemplos de aspectos, la variante de péptido puede comprender una sustitución conservativa con respecto al péptido original, puede

comprender cualquiera de las modificaciones de aminoácidos descritas en la presente, o puede comprender una modificación de aminoácidos que vuelve al aminoácido presente en dicha posición en la secuencia de glucagón natural (SEQ ID NO: 1). En ejemplos de aspectos, la variante de péptido de las presentes descripciones comprende una secuencia de aminoácidos basada en una secuencia de aminoácidos de un péptido de las presentes descripciones pero difiere de una o más de las siguientes formas:

a) la variante de péptido comprende un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado;

b) un aminoácido acilado o un aminoácido alquilado se reemplaza con el aminoácido correspondiente del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en dicha posición o una sustitución conservativa del aminoácido natural y, opcionalmente se introduce un nuevo aminoácido acilado o alquilado en una posición distinta;

c) la variante de péptido comprende un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrofílico;

d) un aminoácido unido covalentemente a un resto hidrofílico se reemplaza con el aminoácido correspondiente del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en dicha posición y opcionalmente, se introduce un nuevo aminoácido unido covalentemente a un resto hidrofílico en una posición distinta;

e) el aminoácido del extremo C de la variante de péptido comprende una amida del extremo C en lugar de un alfa carboxilato del extremo C;

f) un aminoácido en cualquiera de las posiciones 1 a 29 se reemplaza con el aminoácido correspondiente del glucagón natural (SEQ ID NO: 1) en dicha posición;

g) o cualquier combinación de estos.

Con respecto a cualquiera de las variantes de péptidos que anteceden, en ejemplos de modalidades, la variante de péptido comprende un resto hidrofílico unido covalentemente a un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de la extensión del extremo C o en el extremo C. En ejemplos de aspectos, la variante de péptido comprende un Cys, Lys, Orn, homocisteína y Ac-Phe unido covalentemente a un resto hidrofílico, opcionalmente, donde el Cys, Lys, Orn, homocisteína o Ac-Phe está ubicado en la posición 16, 17, 21, 24, 29, una posición dentro de la extensión del extremo C o en el extremo C de la variante de péptido. En ejemplos de aspectos, el resto hidrofílico es un polietilenglicol.

En ejemplos de aspectos, la variante de péptido comprende un aminoácido acilado o alquilado, opcionalmente, en la posición 10. En ejemplos de aspectos, la variante de péptido comprende un aminoácido acilado o alquilado que comprende una cadena de alquilo de C8 a C20, una cadena de alquilo de C12 a

C18 o una cadena de alquilo de C14 o C16. En ejemplos de aspectos, la variante de péptido comprende un aminoácido acilado o alquilado que es un aminoácido acilado o alquilado de la Fórmula I, Fórmula II o Fórmula III, opcionalmente, donde el aminoácido de la Fórmula I es Lys.

En ejemplos de aspectos, la variante de péptido de las presentes descripciones comprende un aminoácido acilado o alquilado, donde el grupo acilo o el grupo alquilo está unido covalentemente al aminoácido mediante un espaciador, opcionalmente, donde el espaciador es un aminoácido o un dipéptido. En ejemplos de modalidades, el espaciador comprende uno o dos residuos ácidos.

En cualquiera de los ejemplos de modalidades que anteceden, el péptido o variante de péptido de cualquiera de las presentes descripciones exhibe una (EC50 en el receptor de glucagón)/(EC50 en el receptor de GLP-1) que es de alrededor de 20 o menos (por ej., 20, 19, 18, 17,. 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.10, 0. 05, 0. 025, 0. 01, 0.001).

En cualquiera de los ejemplos de modalidades que anteceden, el péptido o variante de péptido de cualquiera de las presentes descripciones exhibe una (EC50 en el receptor de glucagón)/(EC50 en el receptor de GLP-1) que es mayor a 20

(por ej., 21, 25, 30, 40, 50 , 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000 o más).

En cualquiera de los ejemplos de modalidades que anteceden, el péptido o variante de péptido de cualquiera de las presentes descripciones exhibe una EC50 en el receptor de GLP-1 que es de dos a diez veces (por ej., 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 veces) más que la EC50 en el receptor de glucagón.

EXCLUSIONES

En ejemplos de modalidades, cualquiera de los siguientes péptidos se excluyen de los análogos de glucagón descritos en la presente, si bien se pueden incluir en la invención cualquiera de los siguientes péptidos que comprenden una o más modificaciones adicionales de estos, tal como se describe en la presente, que exhiben la actividad de GLP-1 o coagonista, composiciones farmacéuticas, kits y métodos de tratamiento deseados usando dichos compuestos. El péptido de la SEQ ID NO: 1 con una sustitución de [Arg12] y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con sustituciones de [Arg12,Lys20] y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con sustituciones de [Arg12,Lys24] y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con sustituciones de [Arg12,Lys29] y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con una sustitución de [Glu9]; El péptido de la SEQ ID NO: 1 sin His1, con

sustituciones de [Glu9, Glu16, Lys29] y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con sustituciones de [Glu9, Glu16, Lys29] y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con sustituciones de [Lys13, Glu17] unidas mediante un puente de lactama y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 con sustituciones de [Lys17, Glu21] unidas mediante un puente de lactama y con una amida en el extremo C; El péptido de la SEQ ID NO: 1 sin His1, con sustituciones de [Glu20, Lys24] unidas mediante un puente de lactama. En algunas modalidades, el análogo de glucagón no es ninguno de los péptidos descritos en ninguna de la: solicitud de patente internacional No. PCT/US2009/034448, presentada el 19 de febrero de 2009, y publicada el 26 de agosto de 2010, como WO 2010/096052; solicitud de patente internacional No. PCT/US2009/068678, presentada el 18 de diciembre de 2009, y publicada el 26 de agosto de 2010, como WO 2010/096142; solicitud de patente internacional No. PCT/US2009/047438, presentada el 16 de junio de 2009, y publicada el 23 de diciembre de 2009 como WO 2009/155258; solicitud de patente internacional No. PCT/US2008/053857, presentada el 13 de febrero de 2008, y publicada el 21 de agosto de 2008, como WO 2008/101017; solicitud de patente internacional No. PCT/US2010/059724, presentada el 9 de diciembre de 2010; solicitud de patente internacional No. PCT/US2009/047447, presentada el 16 de junio de 2009, y publicada el 28 de enero de 2010, como WO2010/011439;

solicitud de patente internacional No. PCT/US2010/38825, presentada el 16 de junio de 2010, y publicada el 23 de diciembre de 2010, como WO2010/148089; solicitud de patente internacional No. PCT/US2011/022608, presentada el 26 de enero de 2011; y la solicitud provisional estadounidense No. 61/426,285, presentada el 22 de diciembre de 2010; las cuales se incorporan a la presente mediante esta referencia en su totalidad. En algunas modalidades, el análogo de glucagón no incluye todo o parte de la secuencia KRNRNNIA unida al extremo C luego de la posición 29, por ej., KRNR.

MÉTODOS PARA REALIZAR PÉPTIDOS

Los análogos de glucagón de la descripción se pueden obtener mediante métodos conocidos en la técnica. Los métodos adecuados para sintetizar péptidos de cero se describen en, por ejemplo, Chan et ál., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et ál., Oxford University Press, Oxford, Reino Unido, 2000; y patente estadounidense No. 5,449,752.

Además, en los casos en que los análogos de la descripción no comprenden ninguno de los aminoácidos no codificados o no naturales, el análogo de glucagón se puede

producir de forma recombinante usando un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del análogo usando los métodos recombinantes estándar. Véase, por ejemplos, Sambrook et ál., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et ál., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons, NY, 1994.

En algunas modalidades, se aislaron los análogos de glucagón de la descripción. En algunas modalidades, se purificaron los análogos de glucagón de la descripción. Se reconoce que "pureza" es un término relativo, y no necesariamente debe interpretarse como pureza absoluta, enriquecimiento absoluto o selección absoluta. En algunos aspectos, la pureza es al menos o alrededor de 50%, al menos o alrededor de 60%, al menos o alrededor de 70%, al menos o alrededor de 80%, o al menos o alrededor de 90% (por ej., al menos o alrededor de 91%, al menos o alrededor de 92%, al menos o alrededor de 93%, al menos o alrededor de 94%, al menos o alrededor de 95%, al menos o alrededor de 96%, al menos o alrededor de 97%, al menos o alrededor de 98%, al menos o alrededor de 99% o es aproximadamente 100%.

En algunas modalidades, los péptidos descritos en la presente son sintetizados comercialmente por empresas como Synpep (Dublín, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg,

MD), y Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). En este sentido, los péptidos pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y/o purificados.

CONJUGADOS

La invención proporciona adicionalmente conjugados que comprenden uno o más de los análogos de glucagón descritos en la presente, conjugados a un resto heterólogo, donde el conjugado presenta una mejor actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural, y presenta al menos 100 veces más selectividad para el receptor de GLP-1 humano en comparación con el receptor de GIP. Tal como se usa en la presente, el término "resto heterólogo" es sinónimo del término "resto conjugado" y se refiere a cualquier molécula (química o bioquímica, de origen natural o no codificada) que es distinta de los análogos de glucagón descritos en la presente. Los ejemplos de restos conjugados que pueden unirse a cualquiera de los análogos descritos en la presente incluyen, de modo no taxativo, un polipéptido o péptido heterólogo (incluyendo, por ejemplo, una proteína plasmática), un agente diana, una inmunoglobulina o parte de este (por ej., región variable, CDR o región Fc), una etiqueta de diagnóstico, tal como un radioisótopo, fluoróforo o etiqueta enzimática, un polímero que incluye polímeros solubles en agua u otros agentes terapéuticos o de diagnóstico. En algunas

modalidades, se proporciona un conjugado que comprende un análogo de la presente invención y una proteína plasmática, donde la proteína plasmática se selecciona del grupo que consiste en albúmina, transferrina, fibrinógeno y globulinas. En algunas modalidades, el resto de proteína plasmática del conjugado es albúmina o transferrina. En algunas modalidades, el conjugado comprende uno o más de los análogos de glucagón descritos en la presente y uno o más de: un péptido (que es distinto de los análogos de glucagón activos del receptor de glucagón y/o GLP-1 descritos en la presente), un polipéptido, una molécula de ácido nucleico, un anticuerpo o fragmento de este, un polímero, un punto cuántico, una molécula pequeña, una toxina, un agente de diagnóstico, un carbohidrato, un aminoácido.

En algunas modalidades, el resto heterólogo es un péptido que es distinto de los análogos activos del receptor de glucagón y/o GLP-1 descritos en la presente y el conjugado es un péptido de fusión o un péptido quimérico. En algunas modalidades, el resto heterólogo es una extensión de péptido de 1-21 aminoácidos. En modalidades específicas, la extensión está unida al extremo C del análogo de glucagón, por ej., al aminoácido en la posición 29.

En algunos aspectos específicos, la extensión es un aminoácido simple o dipéptido. En modalidades específicas, la

extensión comprende un aminoácido que se selecciona del grupo que consiste en: un aminoácido con carga (por ej., un aminoácido con carga negativa (por ej., Glu), un aminoácido con carga positiva), un aminoácido que comprende un resto hidrofílico. En algunos aspectos, la extensión es Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu.

En algunas modalidades, la extensión comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 10 (GGPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 8 (KRNRNNIA) o SEQ ID NO: 11 (KRNR). En aspectos específicos, la secuencia de aminoácidos está unida mediante el aminoácido del extremo C del análogo de glucagón, por ej., el aminoácido en la posición 29. En algunas modalidades, la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13-16 está unida al aminoácido 29 del análogo de glucagón mediante un enlace de péptido. En algunas modalidades específicas, el aminoácido en la posición 29 del análogo de glucagón es un Gly y el Gly está fusionado a una de las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8-11.

En algunas modalidades, el resto heterólogo es un polímero. En algunas modalidades, el polímero se selecciona del grupo que consiste en: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de estos incluyendo, polialquilenglicoles, polialquilenóxidos, polialquileno tereftalatos, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos,

incluyendo poli(metil metacrilato), poli(etil metacrilato), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato) y poli(octadecil acrilato), polímeros de polivinilo que incluyen alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(vinil acetato) y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y co-polímeros de estos, celulosas que incluyen celulosa de alquilo, celulosas de hidroxialquilo, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitro celulosas, celulosa de metilo, celulosa de etilo, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, acetato butirato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, celulosa de carboxiletilo, triacetato de celulosa y sal sódica de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos que incluyen poli(etilenglicol), poli(etilenóxido) y poli(etilentereftalato) y poliestireno.

En algunos aspectos, el polímero es un polímero biodegradable, incluyendo un polímero biodegradable sintético (por ej., polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, ácido poli(bútico), ácido poli(valérico) y poli(lactida-

cocaprolactona)) y un polímero biodegradable natural (por ej., alginato y otros polisacáridos incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de estos (sustituciones, adicionales de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones y otras modificaciones realizadas de forma rutinaria por parte de los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrofílicas (por ej., zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas)), así como cualquier copolímero o mezcla de estos. En general, estos materiales se degradan tanto mediante hidrólisis enzimática como mediante exposición al agua *in vivo*, mediante erosión superficial o en masa.

En algunos aspectos, el polímero es un polímero bioadherente, tal como un hidrogel bioerosionable descrito por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubbell en Macromolecules, 1993, 26, 581-587, cuyas enseñanzas se incorporan a la presente, ácidos polihialurónicos, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metil metacrilatos), poli(etil metacrilatos), poli(butilmetacrilato), poli(isobutil metacrilato), poli(hexilmetacrilato), poli(isodecil metacrilato), poli(lauril metacrilato), poli(fenil metacrilato), poli(metil acrilato), poli(isopropil acrilato), poli(isobutil acrilato) y poli(octadecil acrilato).

En algunas modalidades, el polímero es un polímero soluble en agua o un polímero hidrofílico. Los polímeros hidrofílicos se describen adicionalmente en la presente en "Restos hidrofílicos". Los polímeros solubles en agua adecuados son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, hidroxipropiletilcelulosa, hidroxipropilbutilcelulosa, hidroxipropilpentilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa (Ethocel), hidroxietilcelulosa, varias alquilcelulosas e hidroxialquilcelulosas, varios éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa de calcio, copolímeros de acetato de vinilo/ácido crotónico, poli-hidroxialquilmetacrilato, hidroximetilmetacrilato, copolímeros de ácido metacrílico, ácido polimetacrílico, polimetilmetacrilato, copolímeros de anhídrido maleico/metilviniléter, alcohol polivinílico, ácido poliacrílico de sodio y calcio, ácido poliacrílico, polímeros de carboxi ácido, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxietileno polioxipropileno, anhídrido co-maleico de polimetilviniléter, carboximetilamida, copolímero de metacrilato de potasio divinilbenceno, polioxietilenglicoles, polietilenóxido y derivados, sales y combinaciones de estos.

En modalidades específicas, el polímero es un polialquilenglicol, incluyendo, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

En algunas modalidades, el resto heterólogo es un carbohidrato. En algunas modalidades, el carbohidrato es un monosacárido (por ej., glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ej., sucrosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ej., rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidano, galactomanano.

En algunas modalidades, el resto heterólogo es un lípido. El lípido, en algunas modalidades, es un ácido graso, eicosanoide, prostaglandina, leucotrieno, tromboxano, N-acil etanolamina), glicerolípido (por ej., gliceroles mono-, di-, tri-sustituidos), glicerofosfolípido (por ej., fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ej., esfingosina, ceramida), esterol lípido (por ej., esteroide, colesterol), prenol lípido, sacarolípido o un policétido, aceite, cera, colesterol, esterol, vitamina soluble en grasa, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

En algunas modalidades, el resto heterólogo está unido mediante una unión no covalente o covalente al análogo de la

presente descripción. En determinados aspectos, el resto heterólogo está unido al análogo de la presente descripción mediante un enlazador. La unión se puede lograr mediante enlaces químicos covalentes, fuerzas físicas tales como, interacciones electroestáticas, de hidrógeno, iónicas, de van der Waals o hidrofóbicas o hidrofílicas. Se pueden usar varios sistemas de acoplamiento no covalente, incluyendo biotina-avidina, ligando/receptor, enzima/sustrato, ácido nucleico/proteína de unión al ácido nucleico, lípido/proteína de unión al lípido, agente de la molécula de adhesión celular o cualquier agente de unión o fragmentos de estos que presentan afinidad entre sí.

En algunas modalidades, el análogo de glucagón está unido a restos conjugados mediante una unión covalente directa haciendo reaccionar residuos de aminoácidos diana del análogo con un agente de derivación orgánico que se puede hacer reaccionar con las cadenas laterales seleccionadas o los residuos del extremo N o C de estos aminoácidos diana. Los grupos reactivos en el análogo o resto conjugado incluyen, por ej., un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α-haloacetilo, maleimido o hidrazino. Los agentes de derivación incluyen, por ejemplo, éster maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico u otros agentes conocidos en la técnica. De manera

alternativa, los restos conjugados se pueden unir al análogo de manera indirecta mediante portadores intermedios, tales como portadores polisacáridos o polipeptídicos. Los ejemplos de portadores polisacáridos incluyen aminodextrano. Los ejemplos de portadores polipeptídicos adecuados incluyen polilisina, ácido poliglutámico, ácido poliaspártico, co-polímeros de estos y polímeros mezclados de estos aminoácidos y otros, por ej., serinas, para conferir las propiedades de solubilidad deseadas en el portador cargado resultante.

Los residuos de cisteinilo se hacen reaccionar más comúnmente con α-haloacetatos (y aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético, cloroacetamida, para proporcionar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los residuos de cisteinilo también se derivan mediante la reacción con bromotrifluoroacetona, ácido alfa-bromo-β-(5-imidozoil)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de 2-piridilo de metilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los residuos de histidilo se derivan mediante la reacción con dietilpirocarbonato a pH 5.5-7.0 debido a que este agente es relativamente específico para la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil;

la reacción se realiza preferentemente en 0.1 M de cacodilato de sodio a pH 6.0.

Los residuos de lisinilo y del extremo amino se hacen reaccionar con ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivación con estos agentes tiene el efecto de revertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar los residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitrobencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacción catalizada por transaminasa con glioxilato.

Los residuos de arginilo se modifican mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pKa del grupo funcional de guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo epsilon-amino de arginina.

La modificación específica de los residuos de tirosilo se puede realizar, con interés particular en la introducción de marcadores espectrales en residuos de tirosilo mediante reacción con compuestos de diazonio aromático o

tetranitrometano. Más comúnmente se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente.

Los grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) se modifican selectivamente mediante reacción con carbodiimidas (R-N=C=N-R'), donde R y R' son grupos alquilo diferentes, tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones de amonio.

Otras modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)), la desamidación de asparagina o glutamina, la acetilación de la amina del extremo N y/o la amidación o esterificación del grupo de ácido carboxílico del extremo C.

Otro tipo de modificación covalente implica acoplar química o enzimáticamente glucósidos al análogo. Los azúcares se pueden unir a (a) arginina e histidina, (b) grupos

carboxilo libres, (c) grupos sulfhidrilo libres, tales como los de cisteína, (d) grupos hidroxilo libres, tales como los de serina, treonina o hidroxiprolina, (e) residuos aromáticos, tales como los de tirosina o triptófano o (f) el grupo amida de glutamina. Estos métodos se describen en WO87/05330 publicada el 11 de setiembre de 1987 y en Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

En algunas modalidades, el análogo de glucagón se conjuga a un resto heterólogo mediante una unión covalente entre una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón y el resto heterólogo. En algunas modalidades, el análogo de glucagón se conjuga a un resto heterólogo mediante la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24 o 29, una posición dentro de una extensión del extremo C, o el aminoácido del extremo C, o una combinación de estas posiciones. En algunos aspectos, el aminoácido está unido covalentemente a un resto heterólogo (por ej., el aminoácido que comprende un resto heterólogo) es un Cys, Lys, Orn, homo-Cys o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un resto heterólogo.

En algunas modalidades, el conjugado comprende un enlazador que une el análogo de glucagón al resto heterólogo. En algunos aspectos, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a alrededor de 60 o 1 a 30 átomos o más, 2 a 5

átomos, 2 a 10 átomos, 5 a 10 átomos o 10 a 20 átomos de longitud. En algunas modalidades, los átomos de la cadena son todos átomos de carbono. En algunas modalidades, los átomos de la cadena en la estructura del enlazador se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N y S. Los átomos y los enlazadores de la cadena se pueden seleccionar de acuerdo con su solubilidad esperada (hidrofilicidad) de modo de proporcionar un conjugado más soluble. En algunas modalidades, el enlazador proporciona un grupo funcional que se somete a escisión mediante una enzima u otro catalizador o a condiciones hidrolíticas que se encuentran en el tejido, órgano o célula diana. En algunas modalidades, la longitud del enlazador es suficiente como para reducir el potencial de impedimento estérico. Si el enlazador es un enlace covalente o un enlace peptídico y el conjugado es un polipéptido, todo el conjugado puede ser una proteína de fusión. Dichos enlazadores peptídicos pueden ser de cualquier longitud. Los ejemplos de enlazadores son de alrededor de 1 a 50 aminoácidos de longitud, 5 a 50, 3 a 5, 5 a 10, 5 a 15 o 10 a 30 aminoácidos de longitud. Dichas proteínas de fusión se pueden producir, de manera alternativa, mediante métodos recombinantes de ingeniería genética conocidos por un experto en la técnica.

Conjugados: Fusiones de Fc

Tal como se indicó anteriormente, en algunas modalidades, los análogos están conjugados, por ej., fusionados a una inmunoglobulina o parte de esta (por ej., región variable, CDR o región Fc). Los tipos conocidos de inmunoglobulinas (Ig) incluyen IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. La región Fc es una región del extremo C de una cadena pesada Ig, que es responsable de la unión a los receptores Fc que llevan a cabo actividades, tales como, reciclar (que da como resultado una vida media prolongada), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Por ejemplo, de acuerdo con algunas definiciones, la región Fc de cadena pesada IgG humana se extiende desde el Cys226 hasta el extremo C de la cadena pesada. La "región bisagra", en general, se extiende desde Glu216 hasta Pro230 de la IgG1 humana (las regiones bisagra de otros isotipos IgG se pueden alinear con la secuencia IgG1 alineando las cisteínas involucradas en la unión de cisteínas). La región Fc de una IgG incluye dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana, en general, se extiende desde los aminoácidos 231 hasta el aminoácido 341. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana, en general, se extiende desde los aminoácidos 342 hasta 447. Las referencias a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos o regiones de inmunoglobulinas, están basadas en Kabat et ál. 1991,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md. En modalidades relacionadas, la región Fc puede comprender una o más regiones constantes naturales o modificadas de una cadena pesada de inmunoglobulina, distinta de CH1, por ejemplo, las regiones CH2 y CH3 de IgG e IgA, o las regiones CH3 y CH4 de IgE.

Los restos conjugados adecuados incluyen partes de la secuencia de inmunoglobulinas que incluyen el sitio de unión FcRn. FcRn, un receptor de rescate, es responsable de reciclar inmunoglobulinas y de devolverlas a la circulación en la sangre. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor de FcRn se describió basándose en la cristalografía de rayos X (Burmeister et ál. 1994, Nature 372:379). La principal área de contacto de Fc con la FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos de Fc-FcRn se encuentran todos dentro de una única cadena pesada de Ig. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3.

Algunos restos conjugados pueden incluir sitios de unión a FcγR o no. Las FcγR son responsables de la ADCC y CDC. Los ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que tienen contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región

de bisagra inferior), aminoácidos 265-269 (bucle B/C), aminoácidos 297-299 (bucle C'/E), y bucle de aminoácidos 327-332 (F/G) (Sondermann et ál., Nature 406: 267-273, 2000). La región de bisagra inferior de IgE también ha sido involucrada en la unión a FcRI (Henry, et ál., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997). Los residuos involucrados en la unión al receptor de IgA se describen en Lewis et ál., (J Immunol. 175:6694-701, 2005). Los residuos de aminoácidos involucrados en la unión al receptor de IgE se describen en Sayers et ál. (J Biol Chem. 279(34):35320-5, 2004).

Las modificaciones de aminoácidos se pueden llevar a cabo a la región Fc de una inmunoglobulina. Dichas variantes de regiones Fc comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH3 de la región Fc (residuos 342-447) y/o al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH2 de la región Fc (residuos 231-341). Las mutaciones que se cree que imparten una mayor afinidad por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A y N434A (Shields et ál. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591). Otras mutaciones pueden reducir la unión de la región Fc a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB y/o FcγRIIIA sin reducir significativamente la afinidad por FcRn. Por ejemplo, la sustitución de Asn en la posición 297 de la región Fc con Ala u otro aminoácido retira un sitio de glicosilación N altamente conservado y puede dar como resultado menor inmunogenicidad con semivida prolongada concomitante de la

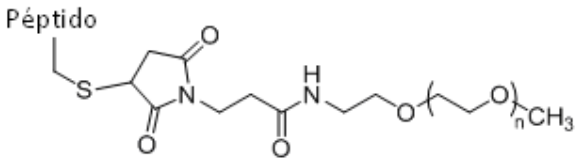
región Fc, así como una disminución de la unión a FcγRs (Routledge et ál. 1995, Transplantation 60:847; Friend et ál. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et ál. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Se han realizado modificaciones de aminoácidos en las posiciones 233-236 de IgG1 que reducen la unión a FcγRs (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 and Armour et ál. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). En las patentes estadounidenses 7,355,008 y 7,381,408 se describen algunos ejemplos de sustituciones de aminoácidos, cada una de las cuales se incorpora a la presente mediante esta referencia en su totalidad.

Conjugados: Restos hidrofílicos

Los análogos de glucagón descritos en la presente se pueden modificar adicionalmente para mejorar su solubilidad y estabilidad en soluciones acuosas a pH fisiológico, mientras se conserva la actividad biológica alta con respecto al glucagón natural. Los restos hidrofílicos, tales como grupos PEG, se pueden unir a los análogos en todas las condiciones adecuadas usadas para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activada. Se puede usar cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo mediante acilación, alquilación reductiva, adición de Michael, alquilación de tiol u otros métodos de conjugación/ligación quimioselectiva a través de un grupo reactivo en el resto PEG (por ej., un grupo

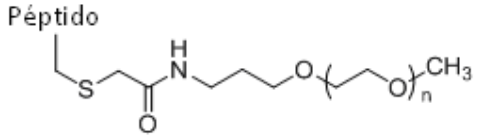
aldehído, amino, éster, tiol, α-haloacetilo, maleimido o hidrazino) a un grupo reactivo en el compuesto diana (por ej., un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α-haloacetilo, maleimido o hidrazino). Los grupos de activación que se pueden usar para unir el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen, de modo no taxativo, grupo sulfona, maleimido, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidrina, oxirano, 5-piridilo y acilo alfa-halogenado (por ej., ácido alfa-yodo acético, ácido alfa bromoacético, ácido alfa cloroacético). Si se une al análogo mediante alquilación reductiva, el polímero seleccionado debería tener un único aldehído reactivo de modo que se controle el grado de polimerización. Véase, por ejemplo, Kinstler et ál., *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts et ál., *Adv. Drug Delivery Rev*. 54: 459-476 (2002); y Zalipsky et él., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995).

En aspectos específicos, se modifica un residuo de aminoácidos del análogo que tiene un tiol con un resto hidrofílico, tal como PEG. En algunas modalidades, el tiol se modifica con PEG activado con maleimido en una reacción de adición de Michael para que dé como resultado un análogo pegilado que comprende el enlace de tioéter que se muestra a continuación:



.

En algunas modalidades, el tiol se modifica con PEG activado con haloacetilo en una reacción de sustitución nucleofílica para que dé como resultado un análogo pegilado que comprende el enlace de tioéter que se muestra a continuación:



.

Los restos hidrofílicos adecuados incluyen polietilenglicol (PEG), propilenglicol, polioles polioxietilados (por ej., POG), sorbitol polioxietilado, glucosa polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), polioxialquilenos, propionaldehído de polietilenglicol, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, mono-(C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de anhídrido etileno/maleico, aminoácidos poli (.beta.) (tanto homopolímeros como copolímeros aleatorios), poli(n-vinil

pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propropilenglicol (PPG) y otros polialquilenóxidos, copolímeros polipropilenóxido/etilenóxido, ácidos colónicos u otros polímeros de polisacárido, Ficoll o dextrano y mezclas de estos. Los dextranos son polímeros de polisacárido de subunidades de glucosa, predominantemente enlazados mediante enlaces α1-6. El dextrano está disponible en muchos rangos de peso molecular, por ej., alrededor de 1 kD a alrededor de 100 kD, o de alrededor de 5, 10, 15 o 20 kD a alrededor de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 kD. Se contemplan polímeros lineales o ramificados. Las preparaciones resultantes de conjugados pueden ser básicamente monodispersas o polidispersas, y pueden tener alrededor de 0.5, 0.7, 1, 1.2, 1.5 o 2 restos de polímero por análogo.

En algunas modalidades, el análogo de glucagón se conjuga a un resto hidrofílico mediante una unión covalente entre una cadena lateral de un aminoácido del análogo de glucagón y el resto hidrofílico. En algunas modalidades, el análogo de glucagón se conjuga a un resto hidrofílico mediante la cadena lateral de un aminoácido en la posición 16, 17, 21, 24 o 29, una posición dentro de una extensión del extremo C, o el aminoácido del extremo C, o una combinación de estas posiciones. En algunos aspectos, el aminoácido que está unido covalentemente a un resto hidrofílico (por ej., el aminoácido que comprende un resto hidrofílico) es un Cys, Lys, Orn, homo-

Cys o Ac-Phe, y la cadena lateral del aminoácido está unida covalentemente a un resto hidrofílico (por ej., PEG).

Conjugados: rPEG

En algunas modalidades, el conjugado de la presente descripción comprende el análogo que tiene actividad agonista de glucagón y/o GLP-1 fusionada a un análogo secundario que puede formar una conformación ampliada similar al PEG químico (por ej., una molécula de PEG recombinante (rPEG)), tales como las que se describen en la publicación de solicitud de patente internacional No. WO2009/023270 y en la publicación de solicitud de patente estadounidense No. US20080286808. La molécula de rPEG, en algunos aspectos, es un polipéptido que comprende uno o más de glicina, serina, ácido glutámico, ácido aspártico, alanina o prolina. En algunos aspectos, el rPEG es un homopolímero, por ej., poli-glicina, poli-serina, ácido poli-glutámico, ácido poli-aspártico, poli-alanina o poli-prolina. En otras modalidades, el rPEG comprende dos tipos de aminoácidos repetidos, por ej., poli(Gly-Ser), poli(Gly-Glu), poli(Gly-Ala), poli(Gly-Asp), poli(Gly-Pro), poli(Ser-Glu), etc. En algunos aspectos, el rPEG comprende tres tipos distintos de aminoácidos, por ej., poli(Gly-Ser-Glu). En aspectos específicos, el rPEG aumenta la semivida del análogo agonista de glucagón y/o GLP-1. En algunos aspectos, el rPEG comprende una carga positiva neta o negativa neta. Al rPEG, en algunos aspectos, le falta estructura secundaria. En algunas

modalidades, el rPEG es mayor o igual a 10 aminoácidos de longitud y, en algunas modalidades, es de alrededor de 40 a alrededor de 50 aminoácidos de longitud. El péptido secundario, en algunos aspectos, se fusiona con el extremo N o C del análogo de la presente descripción a través de un enlace peptídico o un sitio de escisión de proteinasa, o se inserta en los bucles del análogo de la presente descripción. El rPEG, en algunos aspectos, comprende una etiqueta de afinidad o está unido a un PEG que es mayor a 5 kDa. En algunas modalidades, el rPEG confiere el análogo de la presente descripción con un mayor radio hidrodinámico, semivida en suero, resistencia a la proteasa o solubilidad y, en algunos aspectos, confiere al análogo con menor inmunogenicidad.

Conjugados: Multímeros

La invención proporciona adicionalmente multímeros o dímeros de los análogos descritos en la presente, incluyendo homo o heteromultímeros u homo o heterodímeros. Se pueden unir dos o más de los análogos entre sí usando agentes y procedimientos de unión estándar conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se pueden formar dímeros entre dos péptidos a través del uso de reticuladores de tiol bifuncionales y reticuladores de amina bifuncionales, particularmente para los análogos que fueron sustituidos con residuos de cisteína, lisina, ornitina, homocisteína o acetilfenilalanina. El dímero puede ser un homodímero o, de

manera alternativa, puede ser un heterodímero. En determinadas modalidades, el enlazador que conecta los dos (o más) análogos es PEG, por ej., un PEG de 5 kDa, PEG de 20 kDa. En algunas modalidades, el enlazador es un enlace disulfuro. Por ejemplo, cada monómero del dímero puede comprender un residuo de Cys (por ej., un Cys en el extremo o ubicado internamente) y el átomo de azufre de cada residuo de Cys participa en la formación del enlace disulfuro. En algunos aspectos, los monómeros están conectados mediante aminoácidos del extremo (por ej., extremo N o extremo C), mediante aminoácidos internos o mediante un aminoácido del extremo de al menos un monómero y un aminoácido interno de al menos un monómero diferente. En aspectos específicos, los monómeros no están conectados mediante un aminoácido del extremo N. En algunos aspectos, los monómeros del multímero están unidos entre sí en una orientación "cola a cola" donde los aminoácidos del extremo C de cada monómero están unidos entre sí.

COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS, USOS Y KITS

Sales

En algunas modalidades, el análogo de glucagón está en forma de una sal, por ej., una sal farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente, el término "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a sales de los compuestos, que retienen la actividad biológica del compuesto

original, y que no son indeseables biológicamente o de otro modo. Dichas sales se pueden preparar in situ durante el aislamiento y la purificación final del análogo o se pueden preparar por separado mediante la reacción de una función de base libre con un ácido adecuado. Muchos de los compuestos descritos en la presente pueden formar sales ácidas o básicas en virtud de la presencia de los grupos amino y/o carboxilo o grupos similares a estos.

Las sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables se pueden preparar a partir de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales de adición de ácido representativas incluyen, de modo no taxativo, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, bisulfato de sodio, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietansulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, sulfato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-toluenosulfonato y undecanoato. Las sales derivadas de ácidos inorgánicos incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido nítrico, ácido fosfórico y similares. Las sales derivadas de los ácidos orgánicos incluyen ácido

acético, ácido trifluoroacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido málico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido benzoico, ácido cinámico, ácido mandélico, ácido metanosulfónico, ácido etanosulfónico, ácido p-tolueno-sulfónico, ácido salicílico y similares. Los ejemplos de ácidos que se puede utilizar para formar sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, un ácido inorgánico, por ej., ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico y un ácido orgánico, por ej., ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

Las sales de adición básica también se pueden preparar in situ durante el aislamiento y la purificación final de la fuente del ácido salicílico o mediante la reacción de un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco o una amina primaria, secundaria o terciaria orgánica. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen, de modo no taxativo, cationes basados en metales alcalinos o metales alcalinotérreos tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y cationes de amina y amoníaco cuaternario no tóxicos incluyendo amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio,

trimetilamonio, trietilamonio, dietilamonio y etilamonio, entre otros. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de base incluyen, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares. Las sales derivadas de bases orgánicas incluyen, de modo no taxativo, sales de aminas primarias, secundarias y terciarias.

Además, los grupos básicos que contienen nitrógeno se pueden cuaternizar con el análogo de la presente descripción como haluros de alquilo inferior tales como cloruros, bromuros e yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo, haluros de cadena larga tales como cloruros, bromuros e yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo; haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo y otros. De esta manera, se obtienen productos solubles o dispersables en agua y aceite.

Formulaciones:

De acuerdo con algunas modalidades, se proporciona una composición farmacéutica donde la composición comprende un análogo de glucagón de la presente descripción o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede comprender cualquier ingrediente farmacéuticamente aceptable incluyendo, por ejemplo, agentes acidificantes, aditivos,

adsorbentes, propelentes en aerosol, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalinizantes, agentes antitorta, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes amortiguadores, agentes quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, disecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, desintegrantes, agentes dispersantes, agentes potenciadores de la disolución, tintes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de la emulsión, rellenos, agentes formadores de película, potenciadores del sabor, agentes saborizantes, potenciadores del flujo, agentes de gelificación, agentes granulantes, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de ungüento, ungüentos, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases de pastilla, pigmentos, plastificantes, agentes de lustrado, conservantes, agentes secuestrantes, penetrantes de la piel, agentes solubilizantes, solventes, agentes estabilizantes, bases de supositorio, agentes tensioactivos, tensioactivos, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes que aumentan la viscosidad, agentes que absorben el agua, cosolventes miscibles en agua, suavizantes de agua o agentes humectantes.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende cualquiera o una combinación de los siguientes

componentes: acacia, acesulfamo de potasio, acetiltributil citrato, acetiltrietil citrato, ágar, albúmina, alcohol, alcohol deshidratado, alcohol desnaturalizado, alcohol diluido, ácido aleurítico, ácido algínico, poliésteres alifáticos, alúmina, hidróxido de aluminio, estearato de aluminio, amilopectina, α-amilosa, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, aspartama, agua bacteriostática para inyección, bentonita, bentonita magma, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, bronopol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butilparabeno, butilparabeno sodio, alginato de calcio, ascorbato de calcio, carbonato de calcio, ciclamato de calcio, fosfato de calcio anhidro dibásico, fosfato de calcio dehidrato dibásico, fosfato de calcio tribásico, propionato de calcio, silicato de calcio, sorbato de calcio, estearato de calcio, sulfato de calcio, hemihidrato de sulfato de calcio, aceite de canola, carbómero, dióxido de carbono, carboximetilcelulosa de calcio, carboximetilcelulosa de sodio, β-caroteno, carragenano, aceite de risino, aceite de risino hidrogenado, cera emulsificante catiónica, acetato de celulosa, ftalato de acetato de celulosa, etil celulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, celulosa microcristalina silicificada, carboximetilcelulosa de sodio, alcohol cetoestearilo, cetrimida, alcohol cetílico, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, colesterol, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, clorhidrato de

clorhexidina, clorodifluoroetano (HCFC), clorodifluorometano, clorofluorocarbonos (CFC)clorofen oxietanol, oxietanol, cloroxilenol, sólidos de jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro, monohidrato de ácido cítrico, manteca de cacao, agentes colorante, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmelosa sódica, crospovidona, ácido ciclámico, ciclodextrinas, dextratos, dextrina, dextrosa, dextrosa anhidra, diazolidinil urea, dibutil ftalato, dibutil sebacato, dietanolamina, dietil ftalato, difluoroetano (HFC), dimetil-β-ciclodextrina, compuestos tipo ciclodextrina tales como Captisol®, dimetil éter, dimetil ftalato, edentato de dipotasio, edentato de disodio, hidrogenofosfato de disodio, docusato de calcio, docusato de potasio, docusato de sodio, dodecil galato, bromuro de dodeciltrimetilamonio, edentato de calcio y disodio, ácido edtic [sic], eglumina, alcohol etílico, etilcelulosa, etil galato, etil laurato, etil maltol, etil oleato, etilparabeno, etilparabeno de potasio, etilparabeno de sodio, etil vanillina, fructosa, fructosa líquida, fructosa molida, fructosa sin pirógeno, fructosa en polvo, ácido fumárico, gelatina, glucosa, glucosa líquida, mezclas de glicéridos de ácidos grasos vegetales saturados, glicerina, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monoestearato de glicerilo autoemulsionante, palmitoestearato de glicerilo, glicina, glicoles, glicofurol, goma guar, heptafluoropropano (HFC), bromuro de

hexadeciltrimetilamonio, jarabe de alta fructosa, albúmina en suero humana, hidrocarburos (HC), ácido clorhídrico diluido, aceite vegetal hidrogenado, tipo II, hidroxietil celulosa, 2-hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropil celulosa, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, imidurea, carmina de índigo, intercambiadores de ión, óxidos de ión, alcohol isopropílico, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, solución salina isotónica, caolín, ácido láctico, lactitol, lactosa, lanolina, alcoholes de lanolina, lanolina anhidra, lecitina, silicato de magnesio y aluminio, carbonato de magnesio, carbonato de magnesio normal, carbonato de magnesio anhidro, hidróxido de carbonato de magnesio, hidróxido de magnesio, laurilsulfato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, trisilicato de magnesio anhidro, ácido málico, malta, maltitol, solución de maltitol, maltodextrina, maltol, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, meglumina, mentol, metilcelulosa, metacrilato de metilo, metil oleato, metilparabeno, metilparabeno de potasio, metilparabeno de sodio, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio, aceite mineral, aceite mineral liviano, aceite mineral y alcoholes de lanolina, aceite, aceite de oliva, monoetanolamina, montmorilonita, octil galato, ácido oleico, ácido palmítico, parafina, aceite de maní, petrolato,

alcoholes de petrolato y lanolina, glaseado farmacéutico, fenilo, fenol líquido, fenoxietanol, fenoxipropanol, feniletil alcohol, acetato fenilmercúrico, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, polacrilina, polacrilina de potasio, poloxámero, polidextrosa, polietilenglicol, óxido de polietileno, poliacrilatos, polímeros en bloque de polietileno-polioxipropileno, polimetacrilatos, alquiléteres de polioxietileno, derivados de aceite de ricino de polioxietileno, ésteres de ácido graso de polioxietileno sorbitol, polioxietilen estearatos, polivinil alcohol, polivinil pirrolidona, alginato de potasio, benzoato de potasio, bicarbonato de potasio, bisulfita de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, citrato de potasio anhidro, hidrogenofosfato de potasio, metabisulfito de potasio, fosfato de potasio monobásico, propionato de potasio, sorbato de potasio, povidona, propanol, ácido propiónico, carbonato de propileno, propilenglicol, propilenglicol alginato, propil galato, propilparabeno, propilparabeno de potasio, propilparabeno de sodio, sulfato de protamina, aceite de colza, solución de Ringer, sacarina, amonio de sacarina, sacarina de calcio, sacarina de sodio, aceite de cártamo, saponita, proteínas de suero, aceite de sésamo, sílice coloidal, dióxido de silicio coloidal, alginato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bicarbonato de sodio, bisulfita de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio anhidro, dihidrato de citrato de sodio, cloruro de sodio,

ciclamato de sodio, edentato de sodio, dodecilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, metabisulfito de sodio, fosfato de sodio, dibásico, fosfato de sodio, monobásico, fosfato de sodio, tribásico, propionato de sodio anhidro, propionato de sodio, sorbato de sodio, glicolato de almidón de sodio, estearilfumarato de sodio, sulfita de sodio, ácido sórbico, ésteres de sorbitán (ésteres grasos de sorbitán), sorbitol, solución de sorbitol al 70%, aceite de soja, cera espermaceti, almidón, almidón de maíz, almidón de papa, almidón pregelatinizado, almidón de maíz esterilizable, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, estearil alcohol, sucrosa, azúcares, azúcar compresible, azúcar de confitero, esferas de azúcar, azúcar invertida, *Sugartab*, Amarillo Ocaso FCF, parafina sintética, talco, ácido tartárico, tartrazina, tetrafluoroetano (HFC), aceite teobroma, timerosal, dióxido de titanio, alfa tocoferol, acetato de tocoferilo, succinato de ácido alfa tocoferilo, beta tocoferol, delta tocoferol, gamma tocoferol, tragacanto, triacetina, citrato de tributilo, trietanolamina, trietil citrato, trimetil-β-ciclodextrina, bromuro de trimetiltetradecilamonio, amortiguador tris, edentato de trisodio, vanillina, aceite vegetal hidrogenado tipo I, agua, agua blanda, agua dura, agua libre de dióxido de carbono, agua libre de pirógenos, agua para inyección, agua estéril para inhalación, agua estéril para inyección, agua estéril para riego, ceras, cera emulsionante aniónica, cera carnauba, cera emulsionante, cera de cetil éster, cera

microcristalina, cera emulsionante no iónica, cera supositoria, cera blanca, cera amarilla, petrolato blanco, grasa de lana, goma xantano, xilitol, zeína, propionato de zinc, sales de zinc, estearato de zinc o cualquier excipiente en el *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, tercera edición, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, Londres, UK, 2000), que se incorpora en su totalidad mediante referencia. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Decimosexta Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), que se incorpora en su totalidad mediante esta referencia, describe varios componentes usados para formular composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Salvo en la medida en que algún agente convencional sea incompatible con las composiciones farmacéuticas, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas. También se pueden incorporar ingrediente activos complementarios en las composiciones.

En algunas modalidades, los componentes que anteceden pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier concentración, tal como, por ejemplo, al menos A, donde A es 0.0001% p/v, 0.001% p/v, 0.01% p/v, 0.1% p/v, 1% p/v, 2% p/v, 5% p/v, 10% p/v, 20% p/v, 30% p/v, 40% p/v, 50% p/v, 60% p/v, 70% p/v, 80% p/v o 90% p/v. En algunas modalidades, los componentes que anteceden pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier

concentración, tal como, por ejemplo, como máximo B, donde B es 90% p/v, 80% p/v, 70% p/v, 60% p/v, 50% p/v, 40% p/v, 30% p/v, 20% p/v, 10% p/v, 5% p/v, 2% p/v, 1% p/v, 0.1% p/v, 0.001% p/v o 0.0001%. En otras modalidades, los componentes que anteceden pueden estar presentes en la composición farmacéutica en cualquier rango de concentración, tal como, por ejemplo, de alrededor de A a alrededor de B. En algunas modalidades, A es 0.0001% y B es 90%.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. En algunas modalidades, el pH de la composición farmacéutica puede ser de al menos 5, al menos 5.5, al menos 6, al menos 6.5, al menos 7, al menos 7.5, al menos 8, al menos 8.5, al menos 9, al menos 9.5, al menos 10 o al menos 10.5 hasta e incluyendo un pH 11, dependiendo de la formulación y de la vía de administración. En determinadas modalidades, las composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes amortiguadores para alcanzar un pH fisiológicamente compatible. Los agentes amortiguadores pueden incluir cualquier compuesto que se pueda amortiguar al pH deseado, tal como, por ejemplo, amortiguadores de fosfato (por ej., PBS), trietanolamina, Tris, bicina, TAPS, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES y otros. En determinadas modalidades, la potencia del amortiguador es de al menos 0.5 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 30

mM, al menos 40 mM, al menos 50 mM, al menos 60 mM, al menos 70 mM, al menos 80 mM, al menos 90 mM, al menos 100 mM, al menos 120 mM, al menos 150 mM o al menos 200 mM. En algunas modalidades, la potencia del amortiguador es como máximo 300 mM (por ej., como máximo 200 mM, como máximo 100 mM, como máximo 90 mM, como máximo 80 mM, como máximo 70 mM, como máximo 60 mM, como máximo 50 mM, como máximo 40 mM, como máximo 30 mM, como máximo 20 mM, como máximo 10 mM, como máximo 5 mM, como máximo 1 mM).

Vías de administración

La siguiente discusión sobre vías de administración se proporciona simplemente para ilustrar ejemplos de modalidades y no debería interpretarse como restrictiva del alcance de la invención de ningún modo.

Las formulaciones adecuadas para la administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tales como, una cantidad eficaz del análogo de la presente descripción disuelto en diluyentes, tales como agua, solución salina o jugo de naranja; (b) cápsulas, sobrecitos, comprimidos, pastillas y caramelos, cada uno de los cuales contiene una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones

líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las cápsulas pueden ser del tipo de gelatina dura o de recubrimiento blando comunes que contienen, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y rellenos inertes, tales como, lactosa, sucrosa, fosfato de calcio y almidón de maíz. Los comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sucrosa, manitol, almidón de maíz, almidón de papa, ácido algínico, celulosa microcristalina, acacia, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes de amortiguación, agentes desintegrantes, agentes humectantes, conservantes, agentes saborizantes y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las pastillas pueden comprender el análogo de la presente descripción en un sabor, generalmente, sucrosa y acacia o tragacanto, así como pastillas que comprenden el análogo de la presente descripción en una base inerte, tal como gelatina y glicerina o sucrosa y acacia, emulsiones, geles y similares que contienen además dichos excipientes, conocidos en la técnica.

Los análogos de la descripción, solos o en combinación con otros componentes adecuados se pueden administrar mediante

administración pulmonar y se pueden convertir en formulaciones en aerosol para administrarse mediante inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden ubicar en propelentes presurizados aceptables, tales como, diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tales como en un nebulizador o atomizador. Dichas formulaciones de aerosol también se pueden usar para rociar la mucosa. En algunas modalidades, el análogo se formula en una mezcla de polvo o en micropartículas o nanopartículas. Las formulaciones pulmonares adecuadas son conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo., Qian et ál., Int J Pharm 366: 218-220 (2009); Adjei y Garren, Pharmaceutical Research, 7(6): 565-569 (1990); Kawashima et ál., J Controlled Release 62(1-2): 279-287 (1999); Liu et ál., Pharm Res 10(2): 228-232 (1993); publicación de solicitud internacional de patente Nos. WO 2007/133747 y WO 2007/141411.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizadores y conservantes. El término

"parenteral" no se refiere a la administración mediante el canal de alimentación sino mediante otra vía, por ej., subcutánea, intramuscular, intraespinal o intravenosa. El análogo de la presente descripción se puede administrar con un diluyente fisiológicamente aceptable en un portador farmacéutico, tal como un líquido estéril o mezcla de líquidos, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcar relacionadas, un alcohol, tal como etanol o alcohol de hexadecilo, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales, tal como 2,2-dimetil-l53-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres de ácido graso o glicéridos o glicéridos de ácido graso acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o detergente, agente de suspensión, tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa o agentes emulsificantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites, que se pueden usar en formulaciones parenterales incluyen vaselina, aceite animal, vegetal o sintético. Los ejemplos específicos de aceites incluyen maní, soja, sésamo, algodón, maíz, aceituna, vaselina y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido

isoesteárico. Oleato de etilo y miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales alcalinotérreas grasas, de amonio y trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos, tales como, por ejemplo, haluros de dimetildialquilamonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos, tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicérido, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos, tales como, por ejemplo, óxidos de amina grasa, alcanolamidas de ácido graso y copolímeros de polioxietilenpolipropileno, (d) detergentes anfotéricos, tales como, por ejemplo, sales de amonio cuaternario de alquil-β-aminopropionatos y 2-alquil-imidazolina, y (e) mezclas de estos.

Las formulaciones parenterales se pueden presentar en recipientes sellados de dosis unitaria o de dosis múltiple, tales como ampollas y frascos y se pueden almacenar en una condición secada por congelamiento (liofilizada) que requiere únicamente la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua, para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo conocido en la técnica.

Las formulaciones inyectables concuerdan con la invención. Los requisitos para portadores farmacéuticos eficaces para composiciones inyectables son conocidos por los expertos en la técnica (véase, por ejemplo, *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, ed., páginas 238-250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ta ed., páginas 622-630 (1986)).

De manera adicional, el análogo de la presente descripción se puede fabricar en supositorios para administración rectal mezclando con una variedad de bases, tales como, bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal se pueden presentar como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas de aerosol que contienen, además del ingrediente activo, los portadores que se conocen en la técnica como adecuados.

Un experto en la técnica reconocerá que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, el análogo de la descripción se puede formular como complejos de inclusión, tales como, complejos de inclusión de ciclodextrina o liposomas.

Dosis

Se cree que los análogos de la descripción son útiles en los métodos para tratar una enfermedad o afección médica donde el agonismo del receptor de glucagón, el agonismo del receptor GLP-1 o el co-agonismo del receptor de glucagón/receptor GLP-1 tienen incidencia. A los efectos de la descripción, la cantidad o dosis del análogo de la presente descripción administrada debería ser suficiente para efectuar, por ej., una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un período de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del análogo de la presente descripción debería ser suficiente para estimular la secreción de cAMP de células como se describe en la presente o suficiente para disminuir los niveles de glucosa en sangre, niveles grasos, niveles de ingesta de alimentos o peso corporal de un mamífero, en un período de tiempo de alrededor de 1 a 4 minutos, 1 a 4 horas o 1 a 4 semanas o más, por ej., 5 a 20 o más semanas, desde el momento de administración. En determinadas modalidades, el período de tiempo podría incluso ser más largo. La dosis se determinará mediante la eficacia del análogo particular de la presente descripción y la afección del animal (por ej., humano) así como el peso corporal del animal (por ej., humano) a ser tratado.

En la técnica se conocen muchos ensayos para determinar una dosis administrada. A los efectos de la presente, se podría usar un ensayo que comprende comparar la medida en que

los niveles de glucosa en sangre se disminuyen, tras la administración de una dosis dada del análogo de la presente descripción a un mamífero entre un conjunto de mamíferos a cada uno de los cuales se le da una dosis diferente del análogo, para determinar una dosis inicial a ser administrada a un mamífero. La medida en que los niveles de glucosa en sangre se disminuyen tras la administración de una determinada dosis se pueden ensayar por métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos descritos en la presente como Ejemplo 4.

La dosis del análogo de la presente descripción también se determinará por la existencia, naturaleza y medida en que cada efecto secundario adverso podría acompañar la administración de un análogo particular de la presente descripción. Típicamente, el médico tratante decidirá la dosificación del análogo de la presente descripción con la cual tratar a cada paciente individual, tomando en cuenta una variedad de factores, tales como edad, peso corporal, salud general, dieta, sexo, análogo de la presente descripción a ser administrado, vía de administración y la gravedad de la afección que se está tratando. A modo de ejemplo y sin pretender limitar la invención, la dosis del análogo de la presente descripción puede ser alrededor de 0.0001 a alrededor de 1 g/kg de peso corporal del sujeto que está siendo tratado/día, de alrededor de 0.0001 a alrededor de 0.001 g/kg

peso corporal/día o alrededor de 0.01 mg a alrededor de 1 g/kg peso corporal/día.

En algunas modalidades, la composición farmacéutica comprende cualquiera de los análogos descritos en la presente a un nivel de pureza adecuado para la administración a un paciente. En algunas modalidades, el análogo tiene un nivel de pureza de al menos alrededor de 90%, alrededor de 91%, alrededor de 92%, alrededor de 93%, alrededor de 94%, alrededor de 95%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98% o alrededor de 99% y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptables. La composición farmacéutica, en algunos aspectos, comprende el análogo de la presente descripción a una concentración de al menos A, donde A es alrededor de 0.001 mg/ml, alrededor de 0.01 mg/ml, 0 alrededor de 1 mg/ml, alrededor de 0.5 mg/ml, alrededor de 1 mg/ml, alrededor de 2 mg/ml, alrededor de 3 mg/ml, alrededor de 4 mg/ml, alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 6 mg/ml, alrededor de 7 mg/ml, alrededor de 8 mg/ml, alrededor de 9 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 11 mg/ml, alrededor de 12 mg/ml, alrededor de 13 mg/ml, alrededor de 14 mg/ml, alrededor de 15 mg/ml, alrededor de 16 mg/ml, alrededor de 17 mg/ml, alrededor de 18 mg/ml, alrededor de 19 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 21 mg/ml, alrededor de 22 mg/ml, alrededor de 23 mg/ml, alrededor de 24 mg/ml, alrededor de 25 mg/ml o más. En algunas modalidades, la composición

farmacéutica comprende el análogo a una concentración de como máximo B, donde B es alrededor de 30 mg/ml, alrededor de 25 mg/ml, alrededor de 24 mg/ml, alrededor de 23, mg/ml, alrededor de 22 mg/ml, alrededor de 21 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 19 mg/ml, alrededor de 18 mg/ml, alrededor de 17 mg/ml, alrededor de 16 mg/ml, alrededor de 15 mg/ml, alrededor de 14 mg/ml, alrededor de 13 mg/ml, alrededor de 12 mg/ml, alrededor de 11 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 9 mg/ml, alrededor de 8 mg/ml, alrededor de 7 mg/ml, alrededor de 6 mg/ml, alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 4 mg/ml, alrededor de 3 mg/ml, alrededor de 2 mg/ml, alrededor de 1 mg/ml o alrededor de 0.1 mg/ml. En algunas modalidades, las composiciones pueden contener un análogo a un intervalo de concentración de A a B mg/ml, por ejemplo, alrededor de 0.001 a alrededor de 30.0 mg/ml.

Formas diana

Un experto en la técnica comprenderá fácilmente que los análogos de la descripción se pueden modificar en una cantidad de maneras, de forma tal que la eficacia terapéutica o profiláctica del análogo de la presente descripción se vea aumentado mediante la modificación. Por ejemplo, el análogo de la presente descripción se puede conjugar ya sea directa o indirectamente mediante un enlazador a un resto de direccionamiento. Se conoce en la técnica la práctica de los compuestos de conjugación, por ej., los análogos de glucagón

descritos en la presente, a los restos de direccionamiento. Véase, por ejemplo, Wadhwa et ál., *J Drug Targeting*, 3, 111-127 (1995) y patente estadounidense No. 5,087,616. El término "resto de direccionamiento", tal como se usa en la presente, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une a un receptor de superficie celular, de forma tal que el resto de direccionamiento dirija la administración del análogo de la presente descripción a una población de células donde se expresa la superficie del receptor (el receptor de glucagón, el receptor GLP-1). Los restos de direccionamiento incluyen, de modo no taxativo, anticuerpos o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas y cualquier otro ligando natural o no natural, que se une a receptores de superficie celular (por ej., receptor de factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de célula T (TCR), receptor de célula B (BCR), CD28, receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor de acetilcolina nicotínica (nAChR), etc.). Tal como se usa en la presente, un "enlazador" es un lazo, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas una a la otra. Los enlazadores pueden proporcionar un espaciado óptimo de las dos entidades o puede además proporcionar una unión lábil que permita que las dos entidades se separen una de la otra. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, restos lábiles ácidos, restos lábiles básicos y grupos escindibles de enzima. El término "enlazador", en

algunas modalidades, se refiere a cualquier agente o molécula que puentea el análogo de la presente descripción al resto de direccionamiento. Un experto en la técnica reconoce que los sitios en el análogo de la presente descripción, que no son necesarios para la función del análogo de la presente descripción, son sitios ideales para unir un enlazador y/o un resto de direccionamiento, siempre que el enlazador y/o resto de direccionamiento, una vez unido al análogo de la presente descripción, no interfiere/n con la función del análogo de la presente descripción, es decir, la capacidad de estimular la secreción de cAMP de células, para tratar diabetes u obesidad.

Formulaciones de liberación controlada

De manera alternativa, los análogos de glucagón descritos en la presente pueden modificarse en una forma de depósito, de manera tal que la forma en la que el análogo de las presentes descripciones se libera hacia el cuerpo al cual se administra se controle con respecto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, patente estadounidense No. 4,450,150). Las formas de depósito de las presentes descripciones pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprende el análogo de las presentes descripciones y un material poroso o no poroso, tal como un polímero, donde el análogo de las presentes descripciones está encapsulado por o difuso por todo el material y/o degradación del material no poroso. El depósito es implantado luego en la

ubicación deseada dentro del cuerpo y el análogo de las presentes descripciones se libera desde el implante a velocidad predeterminada.

La composición farmacéutica en determinados aspectos se modifica para tener cualquier tipo de perfil de liberación *in vivo*. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación de liberación inmediata, liberación controlada, liberación sostenida, liberación prolongada, liberación retardada o liberación bifásica. Los métodos para formular péptidos para liberación controlada son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Qian et ál., *J Pharm* 374: 46-52 (2009) y publicación de solicitud de patente internacional Nos. WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; y WO 1999/040942.

Las presentes composiciones pueden comprender adicionalmente, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y/o efecto de administración. Las formulaciones farmacéuticas descritas pueden administrarse de acuerdo con cualquier régimen que incluye, por ejemplo, diario (1 vez por día, 2 veces por día, 3 veces por día, 4 veces por día, 5 veces por día, 6 veces por día), cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días,

semanal, dos veces por semana, cada tres semanas, mensual o bimensual.

Combinaciones

Los análogos de glucagón descritos en la presente pueden administrarse solos o en combinación con otros agentes terapéuticos que pretenden tratar o prevenir cualquiera de las enfermedades o afecciones médicas descritas en la presente. Por ejemplo, los análogos de glucagón descritos en la presente pueden coadministrarse (simultánea o secuencialmente) con un agente antidiabético o antiobesidad. Los agentes antidiabéticos conocidos en la técnica o en investigación incluyen insulina, leptina, péptido YY (PYY), péptido pancreático (PP), factor de crecimiento de fibroblastos 21 (FGF21), agonistas del receptor Y2Y4, sulfonilureas, tales como tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), tolazamida (Tolinase), clorpropamida (Diabinese), glipizida (Glucotrol), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepirida (Amaryl) o gliclazida (Diamicron); meglitinidas, tales como repaglinida (Prandin) o nateglinida (Starlix); biguanidas tales como metformina (Glucophage) o fenformina; tiazolidinadionas tales como rosiglitazona (Avandia), pioglitazona (Actos) o troglitazona (Rezulin) u otros inhibidores de PPARγ; inhibidores de alfa glucosidasa que inhiben la digestión de carbohidratos, tales como miglitol (Glyset), acarbosa (Precose/Glucobay); exenatida (Byetta) o

pramlintida; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) tales como vildagliptina o sitagliptina; inhibidores de SGLT (transportador de glucosa dependiente de sodio 1); activadores de glucocinasa (GKA); antagonistas del receptor de glucagón (GRA) o inhibidores de FBPasa (fructosa 1,6-bisfosfatasa).

Los agentes antiobesidad conocidos en la técnica o en investigación incluyen supresores del apetito, que incluyen estimulantes del tipo fenetilaminas, fentermina (opcionalmente con fenfluramina o dexfenfluramina), dietilpropion (Tenuate®), fendimetrazina (Prelu-2®, Bontril®), benzfetamina (Didrex®), sibutramina (Meridia®, Reductil®); rimonabant (Acomplia®), otros antagonistas del receptor de cannabinoide; oxintomodulina; clorhidrato de fluoxetina (Prozac); Qnexa (topiramato y fentermina), Excalia (bupropión y zonisamida) o Contrave (bupropión y naltrexona); o inhibidores de lipasa, similar a XENICAL (Orlistat) o Cetilistat (también denominado ATL-962) o GT 389-255.

Los péptidos descritos en la presente en algunas modalidades se coadministran con un agente para el tratamiento de enfermedad hepática grasa no alcohólica o NASH. Los agentes usados para tratar la enfermedad hepática grasa no alcohólica incluyen ácido ursodesoxicólico (también denominado Actigall, URSO y Ursodiol), Metformina (Glucophage), rosiglitazona (Avandia), Clofibrato, Gemfibrozil, Polimixina B y Betaína.

Los péptidos descritos en la presente en algunas modalidades se coadministran con un agente para el tratamiento de una enfermedad neurodegenerativa, por ej., enfermedad de Parkinson. Los agentes anti enfermedad de Parkinson se conocen adicionalmente en la técnica e incluyen, de modo no taxativo, levodopa, carbidopa, anticolinérgicos, bromocriptina, pramipexol y ropinirol, amantadina y rasagilina.

En vista de lo que antecede, la invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas y kits que comprenden adicionalmente uno de estos otros agentes terapéuticos. El agente terapéutico adicional puede administrarse simultánea o secuencialmente con el análogo de la presente descripción. En algunos aspectos, el análogo se administra antes del agente terapéutico adicional, mientras que en otros aspectos, el análogo se administra luego del agente terapéutico adicional.

Usos

Se contempla que los análogos de glucagón descritos en la presente y las composiciones farmacéuticas relacionadas sean útiles para el tratamiento de una enfermedad o afección médicas, en las cuales por ej., la falta de actividad en el receptor de glucagón, el receptor GLP-1 o en ambos receptores, es un factor en el comienzo y/o evolución de la enfermedad o afección médica. Por consiguiente, la invención proporciona un

método para tratar o prevenir una enfermedad o afección médica en un paciente, donde la enfermedad o afección médica es una enfermedad de afección médica en la cual una falta de activación del receptor GLP-1 y/o activación del receptor de glucagón está asociada con el comienzo y/o la evolución de la enfermedad de afección médica. El método comprende proporcionar al paciente un análogo de acuerdo con cualquiera de los descritos en la presente en una cantidad eficaz para tratar o prevenir la enfermedad o afección médica.

En algunas modalidades, la enfermedad o afección médica es un síndrome metabólico. El síndrome metabólico, también conocido como síndrome metabólico X, síndrome de resistencia a la insulina o síndrome de Reaven, es un trastorno que afecta a más de 50 millones de estadounidenses. El síndrome metabólico se caracteriza típicamente por un agrupamiento de al menos tres o más de los siguientes factores de riesgo: (1) obesidad abdominal (excesivo tejido graso en y alrededor del abdomen), (2) dislipidemia aterogénica (trastornos de lípidos en sangre que incluyen triglicéridos altos, bajo colesterol HDL y alto colesterol LDL que potencia la acumulación de placa en las paredes arteriales), (3) presión sanguínea elevada, (4) resistencia a la insulina o intolerancia a la glucosa, (5) estado protrombótico (por ej., fibrinógeno o inhibidor activador del plasminógeno 1 en sangre altos) y (6) estado proinflamatorio (por ej., proteína C reactiva elevada en

sangre). Otros factores de riesgo pueden incluir envejecimiento, desbalance hormonal y predisposición genética.

El síndrome metabólico está asociado con un aumento del riesgo de enfermedades cardíacas coronarias y otros trastornos relacionados con la acumulación de placa vascular, tales como apoplejía y enfermedad vascular periférica, denominada enfermedad cardiovascular aterosclerótica (ASCVD). Los pacientes con síndrome metabólico pueden progresar desde un estado resistente a la insulina, en sus etapas tempranas, a diabetes tipo II desarrollada con adicional riesgo creciente de ASCVD. Sin pretender limitarse a ninguna teoría en particular, la relación entre la resistencia a la insulina, síndrome metabólico y enfermedad vascular pueden implicar uno o más mecanismos patogénicos concurrentes que incluyen vasodilatación deteriorada estimulada por insulina, reducción asociada a la resistencia a la insulina en disponibilidad de NO debido a estrés oxidativo potenciado y anomalías en hormonas derivadas de adipocitos tales como adiponectina (Lteif and Mather, Can. J. Cardiol. 20 (suppl. B):66B-76B (2004)).

De acuerdo con 2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (ATP III), cualesquiera tres de los siguientes rasgos en el mismo individuo cumplen con el criterio para el síndrome metabólico: (a) obesidad abdominal

(una circunferencia de cintura mayor a 102 cm en hombres y mayor a 88 cm en mujeres); (b) triglicéridos en suero (150 mg/dl o más); (c) colesterol HDL (40 mg/dl o menos en hombres y 50 mg/dl o menos en mujeres); (d) presión sanguínea (130/85 o más); y (e) glucosa en sangre en ayunas (110 mg/dl o más). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), un individuo que tiene niveles altos de insulina (glucosa en sangre en ayunas elevada o glucosa elevada tras los alimentos solo) con al menos dos de los siguientes criterios cumple con el criterio para poseer síndrome metabólico: (a) obesidad abdominal (relación cintura a cadera mayor a 0.9, un índice de masa corporal de al menos 30 kg/m2, o una medición de cintura mayor a 37 pulgadas); (b) el panel de colesterol muestra un nivel de triglicéridos de al menos 150 mg/dl o un colesterol HDL menor a 35 mg/dl; (c) presión sanguínea de 140/90 o más o en tratamiento por presión sanguínea alta). (Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome," ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, 11 de mayo de 2009).

Con fines que obran en la presente, si un individuo cumple con el criterio de alguno o ambos criterios establecidos en 2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel o la OMS, se considera que ese individuo sufre de síndrome metabólico.

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, los péptidos descritos en la presente son útiles para tratar el síndrome metabólico. Por consiguiente, la invención proporciona un método para prevenir o tratar el síndrome metabólico o reducir uno, dos, tres o más factores de riesgo de este, en un sujeto que comprende proporcionar al sujeto un análogo descrito en la presente en una cantidad eficaz para prevenir o tratar el síndrome metabólico o el factor de riesgo de este.

En algunas modalidades, el método trata una afección médica hiperglucémica. En determinados aspectos, la afección médica hiperglucémica es diabetes, diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II o diabetes gestacional, ya sea dependiente o no dependiente de insulina. En algunos aspectos, el método trata la afección médica hiperglucémica al reducir una o más complicaciones de diabetes que incluyen nefropatía, retinopatía y enfermedad vascular.

En algunos aspectos, la enfermedad o afección médica es obesidad. En algunos aspectos, la obesidad es obesidad inducida por fármacos. En algunos aspectos, el método trata la obesidad al evitar o reducir el aumento de peso o aumentar la pérdida de peso en el paciente. En algunos aspectos, el método trata la obesidad al reducir el apetito, disminuir la ingesta de alimentos, reducir los niveles de lípidos del paciente o

disminuir la velocidad de movimiento de los alimentos a través del sistema gastrointestinal.

Debido a que la obesidad está asociada con el comienzo o evolución de otras enfermedades, los métodos para tratar la obesidad son además útiles en métodos para reducir complicaciones asociadas con obesidad incluyendo enfermedad vascular (coronariopatía, apoplejía, enfermedad vascular periférica, isquemia-reperfusión, etc.), hipertensión, comienzo de diabetes tipo II, hiperlipidemia y enfermedades musculoesqueléticas. La invención proporciona por consiguiente métodos para tratar o prevenir estas complicaciones asociadas con la obesidad.

En algunas modalidades, la enfermedad o afección médica es enfermedad hepática grasa no alcohólica (NAFLD). NAFLD se refiere a un amplio espectro de enfermedades hepáticas que van desde hígado graso leve (esteatosis) o esteatohepatitis (NASH) a cirrosis (cicatrices avanzadas e irreversibles del hígado). Todas las etapas de la NAFLD tienen en común la acumulación de grasa (infiltración grasa) en las células hepáticas (hepatocitos). El hígado graso leve es la acumulación anormal de un tipo de grasa determinado, los triglicéridos, en las células hepáticas sin inflamación o cicatrices. En la NASH, la acumulación de grasa está asociada con los grados cambiantes de inflamación (hepatitis) y cicatrices (fibrosis) del hígado.

Las células inflamatorias pueden destruir las células hepáticas (necrosis hepatocelular). En los términos "esteatohepatitis" y "esteatonecrosis", esteato se refiere a infiltración grasa, hepatitis se refiere a inflamación en el hígado y necrosis se refiere a células hepáticas destruidas. La NASH puede a la larga provocar cicatrices en el hígado (fibrosis) y luego cicatrices avanzadas e irreversibles (cirrosis). La cirrosis causada por la NASH es el estado final y más grave en el espectro de la NAFLD. (Mendler, Michel, “Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH),” ed. Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com, 29 de agosto de 2005).

La enfermedad hepática alcohólica o enfermedad hepática inducida por el alcohol comprende tres enfermedades hepáticas patológicamente distintas relacionadas con o provocadas por el consumo excesivo de alcohol: hígado graso (esteatosis), hepatitis crónica o aguda y cirrosis. La hepatitis alcohólica puede variar de hepatitis leve, siendo las pruebas de laboratorio anormales la única indicación de enfermedad, a disfunción hepática severa con complicaciones tales como ictericia (piel amarilla provocada por retención de bilirrubina), encefalopatía hepática (disfunción neurológica provocada por falla hepática), ascitis (acumulación de líquido en el abdomen), várices esofágicas sangrantes (venas varicosas en el esófago), coagulación anormal de la sangre y coma.

Histológicamente, la hepatitis alcohólica tiene una aparición característica con degeneración vacuolar de hepatocitos, inflamación con neutrófilos y algunas veces cuerpos de Mallory (agregados anormales de proteínas filamentosas intermedias celulares). La cirrosis se caracteriza anatómicamente por nódulos generalizados en el hígado combinado con fibrosis. (Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", sitio web del Columbia University Medical Center).

Sin limitarse a ninguna teoría en particular, los análogos descritos en la presente son útiles para el tratamiento de enfermedad hepática alcohólica, NAFLD o cualquier etapa de esta, que incluyen, por ejemplo, esteatosis, esteatohepatitis, hepatitis, inflamación hepática, NASH, cirrosis o complicaciones de estas. Por consiguiente, la invención proporciona un método para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD o cualquier etapa de esta, en un sujeto que comprende proporcionar a un sujeto un análogo descrito en la presente en una cantidad eficaz para prevenir o tratar la enfermedad hepática alcohólica, NAFLD o la etapa de estas. Dichos métodos de tratamiento incluyen reducción en uno, dos, tres o más de lo siguiente: contenido graso en el hígado, incidencia o evolución de la cirrosis, incidencia de carcinoma hepatocelular, signos de inflamación, por ej., niveles enzimáticos hepáticos anormales (por ej., aspartato aminotransferasa AST y/o alanina aminotransferasa

ALT o LDH), ferritina en suero elevada, bilirrubina en suero elevada y/o signos de fibrosis, por ej., niveles elevados de TGF-beta. En modalidades preferidas, los péptidos se usan para tratar pacientes que han evolucionado más allá del hígado graso leve (esteatosis) y presentan signos de inflamación o hepatitis. Dichos métodos pueden provocar, por ejemplo, la reducción de los niveles de AST y/o ALT.

Se ha demostrado que la GLP-1 y exendina-4 tienen algún efecto neuroprotector. La invención también proporciona usos de los análogos de glucagón descritos en la presente para tratar enfermedades neurodegenerativas, que incluyen de modo no taxativo, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, esclerosis lateral amilotrófica, otros trastornos relacionados con la desmielinación, demencia senil, demencia subcortical, demencia arterioesclerótica, demencia asociada al SIDA, u otras demencias, un cáncer del sistema nervioso central, lesión cerebral traumática, lesión de la médula espinal, apoplejía o isquemia cerebral, vasculitis cerebral, epilepsia, enfermedad de Huntington, síndrome de Tourette, síndrome de Guillain Barre, enfermedad de Wilson, enfermedad de Pick, trastornos neuroinflamatorios, encefalitis, encefalomielitis o meningitis de origen viral, fúngico o bacteriano, u otras infecciones del sistema nervioso central, enfermedades causadas por priones, ataxias cerebelosas, degeneración cerebelosa, síndromes de

degeneración espinocerebelosa, ataxia de Friedreichs, ataxia telangiectasia, amiotrofia espinal, parálisis supranuclear progresiva, distonía, espasmos musculares, temblores, retinitis pigmentosa, degeneración estriatonigral, encefalomiopatías mitocondriales, lipofuscinosis ceroide neuronal, encefalopatías hepáticas, encefalopatías renales, encefalopatías metabólicas, encefalopatías inducidas por toxinas y lesión cerebral inducida por radiación.

En algunas modalidades, la enfermedad o afección médica es hipoglucemia. En algunas modalidades, el paciente es un paciente diabético y la hipoglucemia se induce mediante la administración de insulina. En aspectos específicos, el método comprende proporcionar el análogo de la presente descripción en combinación con insulina, de forma tal que el análogo amortigüe los efectos hipoglucémicos de la administración en bolo de insulina.

En algunas modalidades, los análogos de glucagón se usan junto con la administración parenteral de nutrientes a pacientes no diabéticos en un ambiente de hospital, por ej., a pacientes que reciben nutrición parenteral o nutrición parenteral total. Los ejemplos no taxativos incluyen pacientes de cirugía, pacientes en coma, pacientes con enfermedad del tracto digestivo o un bloqueo del tracto gastrointestinal no funcional (por ej., debido a la remoción quirúrgica) o

capacidad de absorción deteriorada, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, obstrucción del tracto gastrointestinal, fístula del tracto gastrointestinal, pancreatitis aguda, intestino isquémico, cirugía gastrointestinal mayor, determinadas anomalías del tracto gastrointestinal congénitas, diarrea prolongada o síndrome de intestino corto debido a cirugía, pacientes en shock y pacientes que experimentan procesos de curación que generalmente reciben la administración parenteral de carbohidratos junto con diversas combinaciones de lípidos, electrolitos, minerales, vitaminas y aminoácidos. Los análogos de glucagón y la composición de nutrición parenteral se pueden administrar al mismo tiempo, en diferentes momentos, uno antes o después del otro, siempre que el análogo de glucagón ejerza el efecto biológico deseado en el momento que se digiere la composición de nutrición parenteral. Por ejemplo, la nutrición parenteral se puede administrar 1, 2 o 3 veces por día, mientras que el análogo de glucagón se administra una vez cada dos días, tres veces a la semana, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada 2 semanas, una vez cada 3 semanas o una vez por mes.

Tal como se usa en la presente, los términos "tratar" y "prevenir" así como palabras que resultan de allí, no necesariamente implican 100% o la totalidad del tratamiento o la prevención. En vez de eso, hay diversos grados de tratamiento y prevención que el experto en la técnica reconoce

que tienen beneficio potencial o efecto terapéutico. A este respecto, los métodos de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad de cualquier nivel de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección médica en un mamífero. Además, el tratamiento o la prevención proporcionada por el método puede incluir el tratamiento o la prevención de una o más afecciones o síntomas de la enfermedad o afección médica. Por ejemplo, con respecto a los métodos para tratar la obesidad, el método en algunas modalidades, logra una disminución en el consumo de alimentos mediante [sic] o niveles grasos en un paciente. También, a los efectos de la presente, "prevención" puede abarcar retrasar el comienzo de la enfermedad o un síntoma o afección de la misma.

Con respecto a los métodos antes mencionados de tratamiento, el paciente es cualquier hospedador. En algunas modalidades, el hospedador es un mamífero. Tal como se usa en la presente, el término "mamífero" se refiere a cualquier animal vertebrado de la clase de mamíferos, incluyendo, de modo no taxativo, cualquiera de monotrema, marsupial y taxones placentales. En algunas modalidades, el mamífero es uno de los mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsters, y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos. En determinadas modalidades, los mamíferos son del orden Carnivora, que incluyen felinos (gatos) y caninos (perros). En determinadas modalidades, los mamíferos son del orden

Artiodáctilo, que incluyen bovinos (vacas) y porcinos (cerdos) o del orden Perisodáctilos, que incluyen equinos (caballos). En algunos casos, los mamíferos son del orden Primates, Ceboides o Simoides (monos) o del orden Antropoides (humanos y simios). En modalidades particulares, el mamífero es un humano.

Kits

Los análogos de glucagón de la presente descripción pueden proporcionarse de acuerdo con una modalidad como parte de un kit. Por consiguiente, en algunas modalidades, se proporciona un kit para administrar un análogo de glucagón, por ej., un péptido agonista de glucagón, a un paciente que lo necesita, donde el kit comprende un análogo de glucagón tal como se describe en la presente.

En una modalidad el kit se proporciona con un dispositivo para administrar la composición de glucagón a un paciente, por ej., una aguja de jeringa, dispositivo de pluma, inyección a chorro u otro inyector sin aguja. El kit puede incluir alternativa o adicionalmente uno o más recipientes, por ej., frascos, tubos, botellas, jeringas prellenadas de una cámara o multicámara, cartuchos, bombas de infusión (externas o implantables), inyectores a chorro, dispositivos de pluma prellenados y similares, que contienen opcionalmente al análogo de glucagón de forma liofilizada o en solución acuosa.

Los kits en algunas modalidades comprenden instrucciones de uso. De acuerdo con una modalidad el dispositivo del kit es un dispositivo dispensador de aerosol, donde la composición está preenvasada dentro del dispositivo de aerosol. En otra modalidad el kit comprende una jeringa y una aguja, y en una modalidad la composición de glucagón estéril está preenvasada dentro de la jeringa.

Los siguientes ejemplos se brindan simplemente para ilustrar la presente invención y de ninguna manera para limitar su alcance.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Síntesis de fragmentos de péptido de glucagón

Materiales:

Todos los péptidos descritos en la presente en los EJEMPLOS se amidaron a menos que se especifique lo contrario.

Resina MBHA (resina 4-metilbencihidrilamina poliestireno) se usó durante la síntesis de péptidos. Resina MBHA, malla 100-180, 1% de DVB poliestireno reticulado; carga de 0.7-1.0 mmol/g), aminoácidos protegidos con Boc y Fmoc se obtuvieron de Midwest Biotech. La síntesis de péptidos de fase sólida usando aminoácidos protegidos con Boc se llevó a cabo en un sintetizador de péptidos Applied Biosystem 430A. La síntesis

de aminoácidos protegida con Fmoc se llevó a cabo usando el sintetizador de péptidos Applied Biosystems Model 433.

Síntesis de péptidos (escisión HF/ aminoácidos Boc):

La síntesis de estos análogos se llevó a cabo en el sintetizador de péptidos Applied Biosystem Model 430A. Los péptidos sintéticos se construyeron por adición secuencial de aminoácidos a un cartucho con 2 mmol de aminoácido protegido con Boc. Específicamente, la síntesis se llevó a cabo usando acoplamientos simples activados por DEPBT Boc. Al final del paso de acoplamiento, la peptidil-resina se trató con TFA para retirar el grupo protector Boc del extremo N. Se lavó repetidas veces con DMF y este ciclo repetitivo se repitió durante la cantidad deseada de pasos de acoplamiento. Luego del ensamblaje, la protección de cadenas laterales, Fmoc, se retiró por 20% de tratamiento de piperidina y la acilación se llevó a cabo usando DIC. La peptidil-resina al final de toda la síntesis se secó usando DCM y el péptido se escindió de la resina con HF anhidro.

Para la lactamización, se seleccionaron grupos protectores ortogonales para Glu y Lys (por ej., Glu(Fm), Lys(Fmoc)). Luego de retirar los grupos protectores y antes de la escisión de HF, se llevó a cabo la ciclización tal como se describe anteriormente (véase, por ej., publicación de solicitud de patente internacional No. WO2008/101017).

Tratamiento con HF de la resina de peptidilo

La resina de peptidilo se trató con HF anhidro y típicamente proporciona aproximadamente 350 mg (~50% de rendimiento) de un péptido desprotegido bruto. Específicamente, la resina de peptidilo (30 mg hasta 200 mg) se colocó en el recipiente de reacción de fluoruro de hidrógeno (HF) para su escisión. Se agregaron 500 µL de p-cresol al recipiente como un depurador de ión de carbono. El recipiente se unió al sistema HF y se sumergió en la mezcla de metanol/hielo seco. El recipiente se evacuó con una bomba de vacío y se destilaron 10 ml de HF al recipiente de reacción. La mezcla de reacción de la resina de peptidilo y el HF se agitaron durante una hora a 0°C, tiempo después del cual se estableció un vacío y el HF se evacuó rápidamente (10–15 min). El recipiente se retiró cuidadosamente y se llenó con aproximadamente 35 ml de éter para precipitar el péptido y para extraer el p-cresol y grupos protectores orgánicos de molécula pequeña que resultaban del tratamiento con HF. Esta mezcla se filtró usando un filtro de teflón y se repitió dos veces para retirar todo el exceso de cresol. Este filtrado se descartó. El péptido precipitado se disuelve en aproximadamente 20 ml de ácido acético al 10% (ac.). Este filtrado, que contenía el péptido deseado, se recogió y liofilizó.

Se realizó un análisis de HPLC analítico del péptido solubilizado bruto en las siguientes condiciones [4.6 X 30 mm Xterra C8, 1.50 mL/min, 220 nm, amortiguador A 0.1% de TFA/10% de ACN, amortiguador B 0.1% de TFA/100% de ACN, gradiente 5-95% de B durante 15 minutos]. El extracto se diluyó dos veces con agua y se cargó en una columna preparativa de fase inversa 2.2 X 25 cm Vydac C4 y se eluyó usando un gradiente de acetonitrilo en un sistema de HPLC Waters (amortiguador A de 0.1% de TFA/10% de ACN, amortiguador B de 0.1% de TFA/10% de CAN y un gradiente de 0-100% B durante 120 minutos a un flujo de 15.00 ml/min. El análisis HPLC del péptido purificado demostró una pureza mayor a 95% y el análisis de espectrometría de masas, ionización por electrospray se usó para confirmar la identidad del péptido.

Acilación de péptidos

Los péptidos acilados se prepararon como sigue. Los péptidos se sintetizaron en una resina de soporte sólido usando un sintetizador de péptidos CS Bio 4886 o sintetizador de péptidos Applied Biosystems 430A. La química de neutralización in situ se usó como lo describen Schnolzer et ál., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). Para los péptidos acilados, el residuo de aminoácidos diana a ser acilado (por ej., posición diez, con respecto a la numeración de la posición de aminoácidos de SEQ ID NO: 3) se sustituyó con un residuo de lisina N ε -FMOC. El tratamiento del péptido

protegido con BOC en el extremo N completado, con 20% de piperidina en DMF durante 30 minutos retiró los grupos FMOC/formilo. El acoplamiento del residuo Lys de ε-amino libre se logró mediante el acoplamiento de un exceso molar de diez veces de aminoácido espaciador protegido con FMOC (ej. FMOC-Glu-OtBu) o una cadena de acilo (ej. $CH_3(CH_2)_{14}$-COOH) y PyBOP o reactivo de acoplamiento DEPBT en DMF/DIEA. La posterior remoción del grupo FMOC del aminoácido espaciados es seguida por la repetición del acoplamiento con una cadena de acilo. El tratamiento final con 100% de TFA dio como resultado la remoción de cualquier grupo protector de cadena lateral y el grupo BOC de extremo N. Las resinas de péptido se neutralizaron con 5% de DIEA/DMF, se secaron y luego se escindieron del soporte usando HF/p-cresol, 95:5, a 0°C durante una hora. Luego de la extracción del éter, se usó una solución de 5% de HOAc para solvatar el péptido bruto. Luego se verificó que una muestra de la solución contenía el péptido de peso molecular correcto mediante ESI-MS. Los péptidos correctos se purificaron mediante RP-HPLC usando un gradiente lineal de 10% de CH3CN/0.1% de TFA hasta 0.1% de TFA en 100% de CH3CN. Se usó una columna de proteína Vydac C18 22 mm x 250 mm para la purificación. Los análogos de péptido acilados generalmente completaron la elución mediante una relación de amortiguador de 20:80. Las porciones se agruparon entre sí y se verificó la pureza en un RP-HPLC analítico. Las fracciones puras se liofilizaron proporcionando péptido sólidos blancos.

Si un péptido comprendía un puente de lactama y residuos diana a ser acilados, la acilación se realiza como se describe anteriormente tras la adición de ese aminoácido a la estructura del péptido.

PEGilación de péptidos

Para la PEGilación de péptidos, se hicieron reaccionar 40 kDa de metoxi poli(etilenglicol) yodoacetamida (NOF) con un equivalente molar de péptido en 7M de urea, 50mM de amortiguador Tris-HCl usando la cantidad mínima de solvente necesario para disolver tanto el péptido como el PEG en una solución transparente (generalmente menos de 2 mL para una reacción usando 2-3 mg de péptido). Comenzó una agitación vigorosa a temperatura ambiente durante 4-6 horas y la reacción se analizó por RP-HPLC analítica. Los productos PEGilados aparecieron claramente del material de partida con menores tiempos de retención. La purificación se llevó a cabo en una columna Vydac C4 con condiciones similares a aquellas usadas para la purificación de péptidos inicial. La elución ocurrió en relaciones amortiguadoras de alrededor de 50:50. Se encontraron y liofilizaron fracciones de péptido PEGilado puro. Los rendimientos estuvieron por encima del 50%, según la reacción.

Análisis usando espectrometría de masas

Los espectros de masas se obtuvieron usando espectrómetro de masas cuadrupolo electrospray Sciex API-III con una fuente estándar de iones ESI. Las condiciones de ionización usadas son las siguientes: ESI en el modo ión positivo; voltaje de aerosol de iones, 3.9 kV; potencial del orificio, 60 V. El gas cortina y nebulizante usado fue nitrógeno a una velocidad de flujo de .9 L/min. Los espectros de masas se registraron de 600-1800 Thompsons a 0.5 Th por paso y 2 mseg de tiempo de permanencia. La muestra (alrededor de 1mg/mL) se disolvió en 50% de acetonitrilo acuoso con 1% de ácido acético y se introdujo por bomba de jeringa externa a la velocidad de 5 µL/min.

Cuando se analizaron los péptidos en solución PBS por ESI MS, primero se desalaron usando una boquilla de extracción de fase sólida ZipTip con 0.6 µL de resina C4, de acuerdo con instrucciones proporcionadas por el fabricante (Millipore Corporation, Billerica, MA, véase el sitio Web de Millipore de la red mundial en millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737).

Análisis por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC):

Los análisis preliminares se llevaron a cabo con estos péptidos brutos para obtener una aproximación de sus velocidades de conversión relativas en amortiguador de solución salina tamponada con fosfato (PBS) (pH, 7.2) usando

cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y análisis MALDI. Las muestras de péptidos brutas se disolvieron en el amortiguador de PBS a una concentración de 1 mg/ml. 1 ml de la solución resultante se almacenó en un recipiente de HPLC de 1.5 ml que se selló luego e incubó a 37 °C. Las alícuotas de 100µl se extrajeron cada varios intervalos de tiempo, se enfriaron hasta temperatura ambiente y analizaron por HPLC.

Los análisis por HPLC se llevaron a cabo usando un sistema Beckman System Gold Chromatography usando un detector UV a 214 nm. Los análisis por HPLC se llevaron a cabo en una columna C18 Vydac de 150 mm x 4.6 mm. La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. El solvente A contenía 0.1% de TFA en agua destilada y el solvente B contenía 0.1% de TFA en 90% de CH3CN. Se empleó un gradiente lineal (40% a 70% de B en 15 minutos). Los datos se recogieron y analizaron usando software Peak Simple Chromatography.

Las velocidades iniciales de hidrólisis se usaron para medir la constante de velocidad para la disociación de los respectivos profármacos. Las concentraciones del profármaco y el fármaco se estimaron a partir de sus áreas de pico respectivamente. Las constantes de velocidad de disociación de primer orden se determinaron trazando el logaritmo de la concentración del profármaco en diversos intervalos de tiempo. La pendiente de este cuadro da la constante de velocidad "k".

Las semividas de la degradación de los diversos profármacos se calcularon entonces usando la fórmula t1/2 = .693/k.

EJEMPLO 2

Síntesis del péptido de la seq ID No. 17

La seq ID no. 17 del péptido se sintetizó mediante fase sólida usando química Fmoc/t-Bu. Para la preparación del péptido, se derivaron en primer lugar 0.5 g de 2-clorotritil-resina (malla 100-200, 1.18 mmol/g) (GL Biochem) mediante la incubación con 0.8 equivalentes (eq.) Fmoc-Gln(Trt)-OH, 4 eq. con respecto a diisopropiletilamina (DIPEA) de aminoácidos en DCM (diclorometano) seco durante 2 horas. El arreglo de la secuencia de péptido se realizó luego en un multisintetizador de péptido APEX396 (Advanced Biotech). Todos los aminoácidos se disolvieron a una concentración de 0.5 M de DMF (N,N-dimetil formamida). Las reacciones de acilación se realizaron durante 60 min con un exceso de 6 veces de aminoácidos activados sobre los grupos amino libres de resina. Se realizaron acilaciones dobles para Aib2, Aib16, Asp15, His1. Los aminoácidos se activaron con cantidades equimolares de HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil uronio hexafluorofosfato), solución 0.5 M en DMF y un exceso molar de 2 veces de DIEA (N,N-diisopropiletilamina), solución 2 M en NMP (1-metil-2-pirrolidinona).

Los grupos protectores de cadena lateral fueron: terc-butilo para Asp y Glu, Ser, Thr y Tyr; tritilo para Asn, Gln y His; tercbutoxicarbonilo para Lys, Trp y 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo para Arg; Boc-His(Trt)-OH se usó en la síntesis.

La lisina en la posición 10 a ser derivada en la cadena lateral se incorporó como Lys(Alloc). Al final del arreglo, el grupo protector de Alloc se retiró y la síntesis se completó por condensación de los dos residuos de ácido γ-carboxiglutámico (4 eq.) y el ácido palmítico (4 eq.) usando HBTU (4 eq.; (O-benzotriazol-1-il-N,N,N',N'-tetrametiluronio hexafluorofosfato) y DIPEA (8 eq.) como activadores.

Al final de la síntesis, las resinas de péptido secas se trataron individualmente con 25 mL de la mezcla de escisión, 88% de ácido trifluoroacético (TFA), 5% de fenol, 2% de triisopropilsilano y 5% de agua durante 2 horas a temperatura ambiente. La resina se filtró y el volumen de la solución se redujo, luego se agregó a metil-t-butil-éter frío para precipitar el péptido. Luego de la centrifugación, los sedimentos de péptido se lavaron con metil-t-butil éter frío para quitar los depuradores orgánicos. El proceso se repitió dos veces. Los sedimentos finales se secaron, se volvieron a suspender en H_2O, 20% de acetonitrilo y se liofilizaron.

Los péptidos brutos se purificaron por HPLC de fase inversa usando Waters XBridge C18 (50 x 150 mm, 5 µm) preparativa y usando como eluyentes (A) 0.1% de TFA en agua y (B) 0.1% de TFA en acetonitrilo. UPLC analítica se realizó en un cromatógrafo Waters, con un columna BEH130, C18 Acquity, de 1.7 µm, 2.1 x 100 mm, (Waters), a 45 °C, usando H_2O, 0.1% de TFA (A) y CH_3CN, 0.1% de TFA (B) como solventes. El péptido purificado se caracterizó mediante espectrometría de masas por electrospray en un detector Waters SQ.

EJEMPLO 3

La capacidad de cada péptido de inducir cAMP se midió en un ensayo indicador basado en luciferasa de luciérnaga. La producción de cAMP que se induce es directamente proporcional al fragmento de glucagón que se une al glucagón o al receptor GLP-1. Para el bioensayo se emplearon las células HEK293 cotransfectadas con el glucagón o el receptor GLP-1, respectivamente, y el gen de luciferasa unido a un elemento que responde a cAMP.

A las células se las privó de suero mediante el cultivo de 16 horas en medio esencial mínimo modificado con Dulbecco (Invitrogen, Carlsbad, CA) complementado con 0.25% de suero de crecimiento bovino (HyClone, Logan, UT) y luego se incubaron con diluciones en serie de fragmentos de glucagón durante 5 horas a 37°C, 5% de CO2 en placas "Biocat" con 96 pocillos

recubiertas con poli-D-lisina (BD Biosciences, San Jose, CA). Al final de la incubación, se agregaron 100 µl de reactivo de sustrato de luminiscencia LucLite (Perkin Elmer, Wellesley, MA) a cada pocillo. La placa se agitó brevemente, se incubó durante 10 min en la oscuridad y la producción de luz se midió en el contador de centelleo líquido MicroBeta-1450 (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). Las concentraciones eficaces al 50% (EC50) se calcularon usando software Origin (OriginLab, Northampton, MA).

EJEMPLO 4

Las potencias agonistas in vitro del péptido de SEQ ID NO: 17 se determinaron usando células de ovario de hámster chino (CHO-K1) que expresan establemente GLP-1R, GCGR o GIPR. Los grupos isogénicos de líneas celulares estables GLP-1R y GCGR se generaron mediante Invitrogen™ usando su tecnología de integración dirigida Jump-In™ , mientras que las líneas CHO/GIPR estables se generaron mediante técnicas de clonación y transfección clásica (integración aleatoria) con dilución limitada para la selección de clones. Los péptidos se evaluaron in vitro para determinar sus capacidades relativas de estimular la producción de cAMP en diversas líneas celulares usando el kit de ensayo DiscoveRx Hithunter™ cAMP XS+ (cat# 90-0075L) según las instrucciones del kit. Las concentraciones eficaces al 50% (EC50) de los péptidos se calcularon mediante un ajuste de curva de 4 parámetros de

análisis de regresión no lineal con software GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, CA) mediante el trazado de los valores de luminiscencia en comparación con dosis de péptido.

EJEMPLO 5

Los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos como se describe en el listado de secuencia se hicieron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1 o 2 y posteriormente se evaluaron para determinar la actividad de agonista in vitro en cada uno del receptor de glucagón y el receptor GLP-1 como se describe esencialmente en el Ejemplo 3 o 4. En algunos casos, también se probó la actividad del agonista in vitro en el receptor GIP. Los resultados se muestran a continuación en la Tabla 1.

TABLA 1

EQ ID NO:	**Secuencia**	**EC50 (nM) en el receptor de glucagón**	**EC50 (nM) en el receptor GLP-1**	**EC50 (nM) en el receptor GIP**
2	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDAibRAAQDFVQWLMDTKγGlu-amida	0.010	0.003	12.763
3	HaibQGTFTSDYSKYLDERRAaibEFVC(40K-TEPEG)WLLDTKγE-amida	2.806	0.567	139.639
4	HsQGTFTSDK(γGlu-C16)SKYLDERAAQDFVQWLLDTKγGlu-amida	0.003	0.003	976
5	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMornDTKQ-ácido	0.006	0.005	1.901
6	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLLDTKQ-ácido	0.015	0.019	1.038
7	H aib QGTFTSD K(γGlu-γGlu-C16) SKYLD aib RAAQDFVQWLMNTKγGlu-amida	0.11	0.075	> 2000

Se obtuvieron los valores EC_{50} de los péptidos de las SEQ ID No. 12-16 usando el procedimiento del Ejemplo 3. Se obtuvo el valor EC_{50} de los péptidos de la SEQ ID No. 17 usando el procedimiento del Ejemplo 4.

Como se muestra en la Tabla 1, muchos de los péptidos presentan una EC50 en el receptor GLP-1 en el intervalo nanomolar o picomolar.

EJEMPLO 6

Los ratones con obesidad inducida por dieta (DIO) se dividieron en grupos de ocho ratones por grupo y se determinó el peso corporal promedio inicial de cada grupo. Cada grupo de ratones se inyecta subcutáneamente todos los días con una dosis de control de vehículo o péptido durante una semana. Los péptidos evaluados en este estudio fueron los péptidos de SEQ ID NO: 12-16. Las dosis administradas variaron entre 1 y 10 nmol/kg para cada uno de los péptidos evaluados. Se determinaron el peso corporal, la composición corporal, la ingesta de alimentos y los niveles de glucosa en sangre periódicamente a lo largo del período de prueba.

Para determinar mejor el efecto de estos péptidos en los niveles de glucosa en sangre, se realiza un segundo experimento con ratones db/db. En este experimento, los ratones db/db se dividen en grupos de ocho ratones por grupo y se determina el peso corporal promedio inicial de cada grupo. Cada grupo de ratones se inyecta subcutáneamente con una única dosis de un péptido de una de SEQ ID NO: 12-16, donde la dosis está en el intervalo de 3 a 30 nmol/kg. Se determinaron el

peso corporal, la composición corporal, la ingesta de alimentos y los niveles de glucosa en sangre periódicamente a lo largo del período de prueba.

EJEMPLO 7

Los efectos in vivo de determinados péptidos de la invención se confirmaron en ratones con obesidad inducida por dieta (DIO) que se mantuvieron en una dieta alta en grasas durante 16 semanas y que tenían un peso corporal inicial de ~ 47 g. A los ratones se les administró un control de vehículo o una dosis de un péptido diariamente durante nueve días. Los péptidos evaluados en este estudio incluían un péptido de la SEQ ID NO: 12, un péptido de la SEQ ID NO: 17, un péptido de la SEQ ID NO: 18 y un péptido de la SEQ ID NO: 19. Las dosis de cada péptido fueron variadas. Se administró cada uno de los péptidos de SEQ ID NO: 12, 17 y 19 a una dosis de 3 nmol/kg o 9 nmol/kg, mientras que el péptido de SEQ ID NO: 18 se administró a una dosis de 1 nmol/kg, 3 nmol/kg, o 9 nmol/kg. Se midió el cambio de peso corporal cumulativo (en gramos) cada día del estudio y los resultados se muestran en la Figura 1. Los datos se expresan como promedio ± SEM.

Cada uno de los péptidos evaluados en este estudio demostró un efecto de disminución del peso corporal. Cada grupo de ratones a los que se les administró un péptido a una

dosis de 3 nmol/kg o una dosis de 9 nmol/kg demostró un peso corporal disminuido (en comparación con los ratones tratados con vehículo) tan pronto como el Día 1 del estudio. En el Día 9 del estudio, a los ratones que se les había administrado 3 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 12 mostraron una reducción del peso corporal de aproximadamente 5.3%, mientras que los ratones a los que se le administró una dosis de 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 12 mostraron una pérdida de peso corporal de aproximadamente 29.8%. En el Día 9 del estudio, a los ratones que se les había administrado 3 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 17 mostraron una reducción del peso corporal de aproximadamente 9.6%, mientras que los ratones a los que se le administró una dosis de 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 17 mostraron una pérdida de peso corporal de aproximadamente 35.5%. En el Día 9 del estudio, a los ratones que se les había administrado 3 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 18 mostraron una reducción del peso corporal de aproximadamente 12.3%, mientras que los ratones a los que se le administró una dosis de 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 18 mostraron una pérdida de peso corporal de aproximadamente 26.8%. En el Día 9 del estudio, a los ratones que se les había administrado 3 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 19 mostraron una reducción del peso corporal de aproximadamente 8.1%, mientras que los ratones a los que se le administró una dosis de 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 19 mostraron una pérdida de peso corporal de aproximadamente 31.5%.

Además del cambio de peso corporal cumulativo, se midieron los niveles de glucosa ambiente de los ratones DIO. Como se muestra en la Figura 2, los ratones a los que se les administró una dosis de 3 nmol/kg o 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 18 demostraron una disminución significativa en la glucosa ambiente para el Día 4 (−29% en comparación con el vehículo; $P < 0.05$). Los ratones a los que se le dieron 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 19 demostraron una disminución de aproximadamente 40% en los niveles de glucosa en el Día 4 (en comparación con los ratones con control de vehículo; $P < 0.05$), una disminución de aproximadamente 39% en los niveles de glucosa en el Día 7 (en comparación con los ratones con control de vehículo; $P < 0.05$) y una disminución de aproximadamente 269% en los niveles de glucosa en el Día 9 en comparación con los ratones con control de vehículo; $P < 0.05$).

Los ratones a los que se le dieron 9 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 17 demostraron una disminución de aproximadamente 48% en los niveles de glucosa en los Días 4 y 7 (en comparación con los ratones con control de vehículo; $P < 0.05$), una disminución de aproximadamente 45% en los niveles de glucosa en el Día 9 (en comparación con los ratones con control de vehículo; $P < 0.05$). Los ratones a los que se le dieron 3 nmol/kg del péptido de SEQ ID NO: 17 demostraron una disminución de aproximadamente 28% en los niveles de glucosa

en el Día 7 (en comparación con los ratones con control de vehículo; P < 0.05) y una disminución de aproximadamente 19% en los niveles de glucosa en el Día 9 (en comparación con los ratones con control de vehículo; P < 0.05).

EJEMPLO 8

Los efectos in vivo de un péptido de la invención se confirmaron en monos rhesus obesos mediante la administración diaria durante 21 días de un control de vehículo, un producto comercialmente disponible (Liraglutida), un péptido de SEQ ID NO: 20 o un péptido de la SEQ ID NO: 17. La liraglutida se administró a una dosis de 20 µg/kg s.c., mientras que cada uno de los péptidos de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 20 se administró a una dosis de 3 µg/kg s.c. Todos los péptidos tienen farmacocinética comparable (t1/2 ~10 h) y unión de proteína plasmática similar en monos rhesus (> 98%). Se midió el peso corporal y la ingesta de alimentos.

Como se muestra en la Figura 3A, los monos obesos a los que se les administró el péptido de la SEQ ID NO: 17 mostraron una pérdida de peso superior (−1.2 kg en comparación con el punto de referencia y el vehículo, *P* < 0.05), en comparación con Liraglutida y con el péptido de la SEQ ID NO: 20.

Se observó una disminución significativa en la ingesta de alimentos (expresada como un cambio porcentual en comparación con el punto de referencia de la Figura 3B), luego del tratamiento con liraglutida (-13.1 ± 1.9%) o con el péptido de la SEQ ID NO: 17 (-25.7% ± 3.2%, $P < 0.05$ en comparación con Liraglutida). Luego de un reposo farmacológico de una semana, los animales tratados con el péptido de la SEQ ID NO: 17 recuperaron la mayoría del peso que se perdió durante el tratamiento crónico (Día 28). En las Figuras 3A y 3B, los datos se expresan como promedio ± SEM. * $P < 0.05$ en comparación con vehículo ^$P < 0.05$ péptido de la SEQ ID NO: 17 en comparación con Liraglutida.

EJEMPLO 9

Los efectos in vivo de un péptido de la invención se evaluaron en monos rhesus diabéticos (n=7) de 16-26 años de edad con un peso corporal promedio de ~22 kg. A los monos rhesus diabéticos (n=7) de 16-26 años de edad con un peso corporal promedio de ~22 kg se les administró un control de vehículo, Liraglutida a una dosis de 10 µg/kg s.c. o un péptido de SEQ ID NO: 17 a una dosis de 1 µg/kg s.c. durante 10 días.

Se midió el peso corporal durante el estudio y se encontró que no se observó ningún efecto en el peso corporal en estos animales durante el período de tratamiento.

Al final de cada tratamiento, se midió la glucosa en sangre en ayunas (FBG) primero seguida por una prueba de tolerancia a los alimentos (MTT) para evaluar la tolerancia a la glucosa. Como se muestra en la Figura 4, los monos diabéticos tratados con el péptido de la SEQ ID NO: 17 demostraron una FBG significativamente disminuida 120 ± 20 en comparación con 158 ± 15 mg/mL, péptido de la SEQ ID NO: 17 en comparación con el vehículo (−25%), $P<0.05$; Figura 4). Además, los monos tratados con el péptido de SEQ ID NO: 17 demostraron una tolerancia a la glucosa mejorada durante MTT en comparación con los monos de control de vehículo (Figura 4). Los datos se expresan en la Figura 4 como promedio ± SEM. $*P < 0.05$ en comparación con el vehículo.

Todas las referencias, incluyendo publicaciones, solicitudes de patente y patentes, citadas en la presente se incorporan a la presente mediante referencia en la misma medida como si cada referencia se indicara individual o específicamente como incorporada mediante referencia y se establecieran en su totalidad en la presente.

El uso de los términos “un”, “una” y “el” y referentes similares utilizados en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) se deben interpretar como abarcativos tanto del singular como del plural, salvo que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. Los términos "que comprende", "que tiene", "que incluye" y "que contiene" deben interpretarse como términos de final abierto (esto es, como que significa "que incluye, de modo no taxativo"), a menos que se indique lo contrario.

La mención de intervalos de valores en la presente meramente pretende servir como un método taquigráfico para referirse individualmente a cada valor separado que está dentro del intervalo y cada criterio de valoración, a menos que se indique lo contrario en la presente, y cada valor separado y criterio de valoración se incorpora a la memoria descriptiva como si se recitara individualmente en la presente.

Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado, salvo que se indique lo contrario en la presente o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de todos y cualquiera de los ejemplos o las expresiones de ejemplo (por ej., "como") que se proporcionan en la presente pretende meramente iluminar mejor la invención

y no presenta una limitación al alcance de la invención a menos que se reivindique lo contrario. No se debe interpretar ninguna palabra en la memoria descriptiva como una indicación de que algún elemento no reivindicado es esencial para la puesta en práctica de la invención.

Las modalidades preferidas de esta invención se describen en la presente, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para desarrollar la invención. Las variaciones de esas modalidades preferidas serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción que antecede. Los inventores esperan que los expertos utilicen tales variaciones según sea apropiado y pretenden que la invención se practique de una forma diferente a la que se describe específicamente en la presente. Por lo tanto, la presente invención incluye todas las modificaciones y los equivalentes de la materia mencionada en las reivindicaciones adjuntas a la presente según permita la ley. Adicionalmente, toda combinación de los elementos antedichos en todas las variaciones posibles de los mismos se encuentra incluida en la invención, salvo que se indique lo contrario en la presente o que lo contradiga claramente el contexto.

RESUMEN

En la presente se proporcionan péptidos y variantes de péptidos que exhiben una mejora de la actividad en el receptor de GLP-1, en comparación con el glucagón natural.

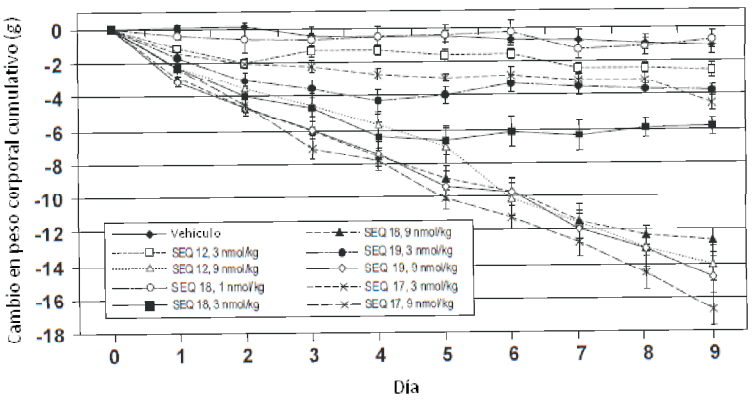

Cambio en peso corporal cumulativo (g)
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Día
Vehículo
SEQ 12, 3 nmol/kg
SEQ 12, 9 nmol/kg
SEQ 18, 1 nmol/kg
SEQ 18, 3 nmol/kg
SEQ 18, 9 nmol/kg
SEQ 19, 3 nmol/kg
SEQ 19, 9 nmol/kg
SEQ 17, 3 nmol/kg
SEQ 17, 9 nmol/kg

FIG. 1

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
27 December 2012 (27.12.2012)

WIPO | PCT

(10) International Publication Number
WO 2012/177443 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 38/26 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) *A61P 3/00* (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2012/042084

(22) International Filing Date:
12 June 2012 (12.06.2012)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/500,027 22 June 2011 (22.06.2011) US
61/547,360 14 October 2011 (14.10.2011) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION** [US/US]; 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **DIMARCHI, Richard, D.** [US/US]; 10890 Wilmington Drive, Carmel, IN 46033 (US). **SMILEY, David, L.** [US/US]; 1013 Sherbrooke Drive, Bloomington, IN 47401 (US).

(74) Agent: **BREEN, John, P.**; Barnes & Thornburg LLP, 11 South Meridian Street, Indianapolis, IN 46204 (US).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

— *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*

— *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report (Rule 48.2(g))*

— *with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))*

(54) Title: GLUCAGON/GLP-1 RECEPTOR CO-AGONISTS

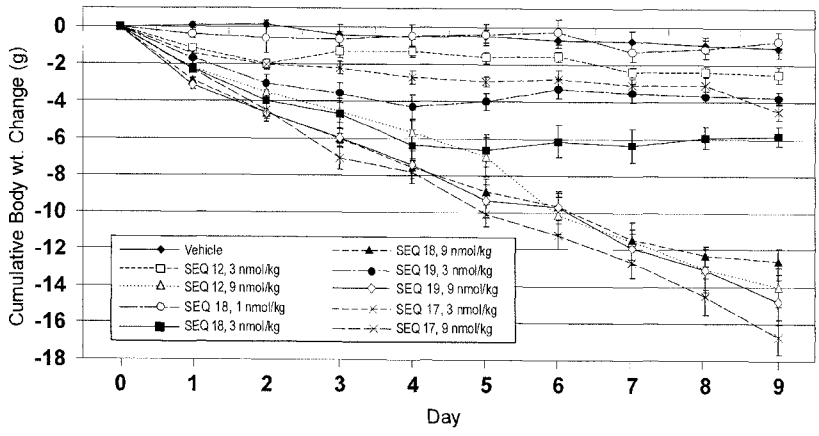


FIG. 1

(57) Abstract: Provided herein are peptides and variant peptides that exhibit enhanced activity at the GLP-1 receptor, as compared to native glucagon.

WO 2012/177443 A2

GLUCAGON/GLP-1 RECEPTOR CO-AGONISTS

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

[0001] This application claims priority to U.S. Provisional Application No. 61/500,027, filed June 22, 2011, and U.S. Provisional Application No. 61/547,360, filed October 14, 2011, each of which are incorporated by reference in their entirety.

INCORPORATION BY REFERENCE OF MATERIAL SUBMITTED ELECTRONICALLY

[0002] Incorporated by reference in its entirety is a computer-readable nucleotide/amino acid sequence listing submitted concurrently herewith and identified as follows: 15 kilobytes ACII (Text) file named "07012KL_PCT_Sequence_Listing.txt," created on May 25, 2012.

BACKGROUND

[0003] Pre-proglucagon is a 158 amino acid precursor polypeptide that is processed in different tissues to form a number of different proglucagon-derived peptides, including glucagon, glucagon-like peptide-1 (GLP-1), glucagon-like peptide-2 (GLP-2) and oxyntomodulin (OXM), that are involved in a wide variety of physiological functions, including glucose homeostasis, insulin secretion, gastric emptying, and intestinal growth, as well as the regulation of food intake. Glucagon is a 29-amino acid peptide that corresponds to amino acids 33 through 61 of pre-proglucagon, while GLP-1 is produced as a 37-amino acid peptide that corresponds to amino acids 72 through 108 of pre-proglucagon. GLP-1(7-36) amide or GLP-1(7-37) acid are biologically potent forms of GLP-1, that demonstrate essentially equivalent activity at the GLP-1 receptor.

[0004] During hypoglycemia, when blood glucose levels drop below normal, glucagon signals the liver to break down glycogen and release glucose, causing blood glucose levels to rise toward a normal level. Hypoglycemia is a common side effect of insulin therapy in patients with hyperglycemia (elevated blood glucose levels) due to diabetes. Thus, glucagon's most recognized role in glucose regulation is to counteract the action of insulin and maintain blood glucose levels.

[0005] GLP-1 has different biological activities compared to glucagon. Its actions include stimulation of insulin synthesis and secretion, inhibition of glucagon secretion, and inhibition of food intake. GLP-1 has been shown to reduce hyperglycemia in diabetics. Exendin-4, a peptide from lizard venom that shares about 50% amino acid

identity with GLP-1, activates the GLP-1 receptor and likewise has been shown to reduce hyperglycemia in diabetics.

[0006] There is also evidence that GLP-1 and exendin-4 may reduce food intake and promote weight loss, an effect that would be beneficial not only for diabetics but also for patients suffering from obesity. Patients with obesity have a higher risk of diabetes, hypertension, hyperlipidemia, cardiovascular disease, and musculoskeletal diseases.

SUMMARY

[0007] The present disclosures provide peptides and variant peptides that exhibit activity at the glucagon receptor, activity at the GLP-1 receptor, or activity at each of the glucagon receptor and the GLP-1 receptor. In exemplary embodiments, the presently disclosed peptides and variant peptides exhibit enhanced activity at the GLP-1 receptor, as compared to native glucagon. In exemplary aspects, the peptides and variant peptides exhibit at least 100-fold selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor.

[0008] The present disclosures further provide conjugates comprising any of the peptides and variant peptides described herein conjugated to a heterologous moiety. In exemplary aspects, the heterologous moiety is a peptide or protein and the conjugate is a fusion peptide or chimeric peptide. In exemplary aspects, the heterologous moiety is a polymer, e.g.,a polyethylene glycol. The present disclosures furthermore provide dimers and multimers comprising any of the peptides and variant peptides described herein.

[0009] The present disclosures moreover provides pharmaceutical compositions comprising any of the peptides and variant peptides described herein and a pharmaceutically acceptable carrier, as well as a method of treating or preventing a disease or medical condition (e.g., metabolic syndrome, diabetes, obesity, liver steatosis, a neurodegenerative disease, hypoglycemia) in a patient. The method comprises administering to the patient a presently disclosed peptide or peptide variant, optionally formulated into a pharmaceutical composition, in an amount effective to treat the disease or medical condition.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0010] Figure 1 represents a graph of the cumulative body weight change (grams) of DIO mice treated with a vehicle control or a dose of a peptide of SEQ ID NO: 12, 17, 18, or 19, as detailed in Example 7.

[0011] Figure 2 represents a graph of the basal glucose (mg/dl) of DIO mice treated with a vehicle control or a dose of a peptide of SEQ ID NO: 12, 17, 18, or 19, as detailed in Example 7.

[0012] Figure 3A represents a graph of the cumulative body weight change (%) of obese rhesus monkeys treated with a vehicle control, Liraglutide (Lira), or a dose of a peptide of SEQ ID NO: 17 or 20, as detailed in Example 8.

[0013] Figure 3B represents a graph of the cumulative food intake (expressed as a percent of food intake on Day 0) of obese rhesus monkeys treated with a vehicle control, Liraglutide, or a dose of a peptide of SEQ ID NO: 17 or 20, as detailed in Example 8.

[0014] Figure 4 represents a graph of blood glucose levels (mg/dL) of diabetic rhesus monkeys treated with a vehicle control or a dose of a peptide of SEQ ID NO: 17, as detailed in Example 9.

DETAILED DESCRIPTION

DEFINITIONS

[0015] The term "about" as used herein means greater or lesser than the value or range of values stated by 10 percent, but is not intended to designate any value or range of values to only this broader definition. Each value or range of values preceded by the term "about" is also intended to encompass the embodiment of the stated absolute value or range of values.

[0016] As used herein, the term “pharmaceutically acceptable carrier” includes any of the standard pharmaceutical carriers, such as a phosphate buffered saline solution, water, emulsions such as an oil/water or water/oil emulsion, and various types of wetting agents. The term also encompasses any of the agents approved by a regulatory agency of the US Federal government or listed in the US Pharmacopeia for use in animals, including humans.

[0017] As used herein the term "pharmaceutically acceptable salt" refers to salts of compounds that retain the biological activity of the parent compound, and which are not biologically or otherwise undesirable. Many of the compounds disclosed herein are capable of forming acid and/or base salts by virtue of the presence of amino and/or carboxyl groups or groups similar thereto.

[0018] Pharmaceutically acceptable base addition salts can be prepared from inorganic and organic bases. Salts derived from inorganic bases, include by way of example only,

sodium, potassium, lithium, ammonium, calcium and magnesium salts. Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary, secondary and tertiary amines.

[0019] As used herein, the term "treating" includes prophylaxis of the specific disorder or condition, or alleviation of the symptoms associated with a specific disorder or condition and/or preventing or eliminating said symptoms. For example, as used herein the term "treating diabetes" will refer in general to altering glucose blood levels in the direction of normal levels and may include increasing or decreasing blood glucose levels depending on a given situation.

[0020] As used herein an "effective" amount or a "therapeutically effective amount" of a glucagon peptide refers to a nontoxic but sufficient amount of the peptide to provide the desired effect. For example one desired effect would be the prevention or treatment of hyperglycemia, e.g., as measured by a change in blood glucose level closer to normal, or inducing weight loss/preventing weight gain, e.g., as measured by reduction in body weight, or preventing or reducing an increase in body weight, or normalizing body fat distribution. The amount that is "effective" will vary from subject to subject, depending on the age and general condition of the individual, mode of administration, and the like. Thus, it is not always possible to specify an exact "effective amount." However, an appropriate "effective" amount in any individual case may be determined by one of ordinary skill in the art using routine experimentation.

[0021] The term, "parenteral" means not through the alimentary canal but by some other route, e.g., subcutaneous, intramuscular, intraspinal, or intravenous.

[0022] As used herein, the term "peptide" encompasses a chain of 3 or more amino acids and typically less than 100 amino acids, wherein the amino acids are naturally occurring or coded or non-naturally occurring or non-coded amino acids. Non-naturally occurring amino acids refer to amino acids that do not naturally occur in vivo but which, nevertheless, can be incorporated into the peptide structures described herein. “Non-coded” as used herein refers to an amino acid that is not an L-isomer of any of the following 20 amino acids: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. “Coded” as used herein refers to an amino acid that is an L-isomer of any of the following 20 amino acids: Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr. In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein are about the same

length as SEQ ID NO: 1 (which is 29 amino acids in length), e.g. 25-35 amino acids in length. Exemplary lengths include 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, or 50 amino acids in length.

[0023] Typically, polypeptides and proteins have a polymer length that is greater than that of "peptides."

[0024] Throughout the application, all references to a particular amino acid position by number (e.g.,position 28) refer to the amino acid at that position in native glucagon (SEQ ID NO: 1) or the corresponding amino acid position in any analogs thereof. For example, a reference herein to "position 28" would mean the corresponding position 27 for a glucagon analog in which the first amino acid of SEQ ID NO: 1 has been deleted. Similarly, a reference herein to "position 28" would mean the corresponding position 29 for a glucagon analog in which one amino acid has been added before the N-terminus of SEQ ID NO: 1. As used herein an "amino acid modification" refers to (i) a substitution or replacement of an amino acid of SEQ ID NO: 1 with a different amino acid (naturally-occurring or coded or non-coded or non-naturally-occurring amino acid), (ii) an addition of an amino acid (naturally-occurring or coded or non-coded or non-naturally-occurring amino acid), to SEQ ID NO: 1 or (iii) a deletion of one or more amino acids of SEQ ID NO: 1.

[0025] "Percent identity" with respect to two amino acid sequences refers to the number of amino acids of the first sequence that match (are identical to) the amino acids in the second reference sequence, divided by the length of the reference sequence, when the two sequences are aligned to achieve maximum correspondence (e.g. gaps can be introduced for optimal alignment).

[0026] Amino acid "modification" refers to an insertion, deletion or substitution of one amino acid with another. In some embodiments, the amino acid substitution or replacement is a conservative amino acid substitution, e.g., a conservative substitution of the amino acid at one or more of positions 2, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28 or 29. As used herein, the term "conservative amino acid substitution" is the replacement of one amino acid with another amino acid having similar properties, e.g.,size, charge, hydrophobicity, hydrophilicity, and/or aromaticity, and includes exchanges within one of the following five groups:

I. Small aliphatic, nonpolar or slightly polar residues:
   Ala, Ser, Thr, Pro, Gly;

II. Polar, negative- charged residues and their amides and esters:

Asp, Asn, Glu, Gln, cysteic acid and homocysteic acid;

III. Polar, positive- charged residues:

His, Arg, Lys; Ornithine (Orn)

IV. Large, aliphatic, nonpolar residues:

Met, Leu, Ile, Val, Cys, Norleucine (Nle), homocysteine

V. Large, aromatic residues:

Phe, Tyr, Trp, acetyl phenylalanine

[0027] In some embodiments, the amino acid substitution is not a conservative amino acid substitution, e.g., is a non-conservative amino acid substitution.

[0028] As used herein the term "charged amino acid" or "charged residue" refers to an amino acid that comprises a side chain that is negative- charged (i.e., de-protonated) or positive- charged (i.e., protonated) in aqueous solution at physiological pH. For example negative- charged amino acids include aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid, homocysteic acid, and homoglutamic acid, whereas positive- charged amino acids include arginine, lysine and histidine. Charged amino acids include the charged amino acids among the 20 coded amino acids, as well as atypical or non-naturally occurring or non-coded amino acids.

[0029] As used herein the term "acidic amino acid" refers to an amino acid that comprises a second acidic moiety (other than the carboxylic acid of the amino acid), including for example, a carboxylic acid or sulfonic acid group.

[0030] As used herein, the term "acylated amino acid" refers to an amino acid comprising an acyl group which is non-native to a naturally-occurring amino acid, regardless of the means by which it is produced (e.g. acylation prior to incorporating the amino acid into a peptide, or acylation after incorporation into a peptide).

[0031] As used herein the term "alkylated amino acid" refers to an amino acid comprising an alkyl group which is non-native to a naturally-occurring amino acid, regardless of the means by which it is produced. Accordingly, the acylated amino acids and alkylated amino acids of the present disclosures are non-coded amino acids.

[0032] As used herein, the term "selectivity" of a molecule for a first receptor relative to a second receptor refers to the following ratio: EC50 of the molecule at the second receptor divided by the EC50 of the molecule at the first receptor. For example, a molecule that has an EC50 of 1 nM at a first receptor and an EC50 of 100 nM at a second receptor has 100-fold selectivity for the first receptor relative to the second receptor.

[0033] As used herein the term "native glucagon" refers to a peptide consisting of the sequence of SEQ ID NO: 1 and the term "native GLP-1" is a generic term that designates GLP-1(7-36) amide, GLP-1(7-37) acid or a mixture of those two compounds.

[0034] As used herein, "glucagon potency" or "potency compared to native glucagon" of a molecule refers to the inverse ratio of the EC50 of the molecule at the glucagon receptor divided by the EC50 of native glucagon at glucagon receptor.

[0035] As used herein, "GLP-1 potency" or "potency compared to native GLP-1" of a molecule refers to the inverse ratio of the EC50 of the molecule at GLP-1 receptor divided by the EC50 of native GLP-1 at GLP-1 receptor.

EMBODIMENTS

[0036] The present disclosures provide peptides and variant peptides that exhibit activity at the GLP-1 receptor, at the glucagon receptor, or at both the GLP-1 receptor and the glucagon receptor. In this regard, the present disclosures provide GLP-1 receptor agonist peptides, glucagon receptor agonist peptides, and GLP-1/glucagon receptor co-agonist peptides. In exemplary embodiments, the presently disclosed peptides and variant peptides exhibit enhanced activity or greater potency at the GLP-1 receptor, as compared to native human glucagon (SEQ ID NO: 1). In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides of the present disclosures exhibit greater potency at the GLP-1 receptor as compared to native human GLP-1 (SEQ ID NO: 2) or one of the active forms thereof (SEQ ID NOs: 5 and 6). In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit greater potency at the glucagon receptor compared to native human GLP-1. In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit greater potency at the glucagon receptor compared to native human glucagon.

[0037] In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit other improvements in properties relative to native glucagon or native GLP-1, such as greater stability, greater solubility, a prolonged half-life in circulation, a delayed onset of action, an extended duration of action, a dampened peak (e.g.,relatively decreased mean peak plasma concentration), and an improved resistance to proteases, such as DPP-IV.

[0038] The peptides and variant peptides described herein are based on the amino acid sequence of native human glucagon (SEQ ID NO: 1), and are described herein as "peptides", "variant peptides","glucagon analogs", "analogs", or "glucagon peptides." It is understood that terms such as "analog" or "variant" or "modifications" encompass

peptides or proteins synthesized *de novo* and do not require the performance of any particular modification step. In some aspects, the peptides and variant peptides described herein comprise a modified amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 comprising 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 amino acid modifications relative to SEQ ID NO: 1, and in some instances, 16 or more (e.g., 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26), amino acid modifications, as further described herein. The following description of glucagon analogs and/or glucagon peptides thus applies to any of the presently disclosed peptides and variant peptides, regardless of the degree of similarity between native human glucagon (SEQ ID NO: 1) and the peptide or variant peptide of the present disclosures.

[0039] It is contemplated that any of the peptide sequences described herein may be further varied by incorporating additional amino acid modifications; for example, by including any of the modifications described herein, e.g., at the positions described herein, or by incorporating conservative substitutions, or by returning to the native glucagon amino acid (see SEQ ID NO: 1) at that position. In exemplary embodiments, the modifications include, e.g., acylation, alkylation, pegylation, truncation at C-terminus, substitution of the amino acid at one or more of positions 1, 2, 3, 7, 10, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 28, and 29. For example, where any of the peptide sequences disclosed herein includes a Cys for purposes of pegylation, a variant peptide may use a different amino acid for pegylation. As another example, a variant peptide may be pegylated at a different position (e.g., replacing the existing Cys with a different amino acid, inserting a new Cys at the proposed pegylation position, and pegylating the new Cys). As yet a further example, where any of the peptide sequences disclosed herein includes a Lys for purposes of acylation, the Lys may be moved to a different position and the new position acylated. In any of the embodiments described herein, the variant peptides may be, for example, 80%, 85%, 90% or 95% identical to the parent peptides over the length of the parent peptides or over amino acids 1-29 of the parent peptide (e.g., may incorporate 1, 2, 3, 4, or 5 additional modifications compared to the parent peptide).

[0040] Conjugates, fusion proteins and multimers of any of the peptide sequences disclosed herein are also contemplated.

ACTIVITY OF THE PEPTIDES AND VARIANT PEPTIDES

Agonist Activity at the Glucagon Receptor

[0041] In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides of the present disclosures exhibit an EC50 at the glucagon receptor of about 1000 μM or less (e.g.,

about 750 μM or less, about 500 μM or less, about 250 μM or less, about 100 μM or less, about 75 μM or less, about 50 μM or less, about 25 μM or less, about 10 μM or less, about 5 μM or less, or about 1 μM or less). In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 for glucagon receptor activation which is in the nanomolar range. For example, the presently disclosed peptides and variant peptides exhibit an EC50 at the glucagon receptor which is about 1000 nM or less (e.g., about 750 nM or less, about 500 nM or less, about 250 nM or less, about 100 nM or less, about 75 nM or less, about 50 nM or less, about 25 nM or less, about 10 nM or less, about 5 nM or less, or about 1 nM or less). In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 at the glucagon receptor which is in the picomolar range. Accordingly, in exemplary aspects, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 for glucagon receptor activation of about 1000 pM or less (e.g., about 750 pM or less, about 500 pM or less, about 250 pM or less, about 100 pM or less, about 75 pM or less, about 50 pM or less, about 25 pM or less, about 10 pM or less, about 5 pM or less, or about 1 pM or less). It is understood that a lower EC50 indicates higher activity or potency at the receptor.

[0042] In some embodiments, the glucagon analogs described herein exhibit an EC50 at the glucagon receptor that is about 0.001 pM or more, about 0.01 pM or more, or about 0.1 pM or more. Glucagon receptor activation (glucagon receptor activity) can be measured by *in vitro* assays measuring cAMP induction in HEK293 cells over-expressing the glucagon receptor, e.g.,assaying HEK293 cells co-transfected with DNA encoding the glucagon receptor and a luciferase gene linked to cAMP responsive element as described in Example 2.

[0043] In exemplary embodiments, the presently disclosed peptides and variant peptides exhibit about 0.001% or more, about 0.01% or more, about 0.1% or more, about 0.5% or more, about 1% or more, about 5% or more, about 10% or more, about 20% or more, about 30% or more, about 40% or more, about 50% or more, about 60% or more, about 75% or more, about 100% or more, about 125% or more, about 150% or more, about 175% or more, about 200% or more, about 250% or more, about 300% or more, about 350% or more, about 400% or more, about 450% or more, or about 500% or higher activity at the glucagon receptor relative to native glucagon (glucagon potency). In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit about 5000% or less or about 10,000% or less activity at the glucagon receptor relative to native glucagon.

A glucagon analog's activity at a receptor relative to a native ligand of the receptor is calculated as the inverse ratio of EC50s for the glucagon analog vs. the native ligand.

[0044] In some embodiments, the peptides and variant peptides exhibit substantial activity (potency) at only the glucagon receptor and little to no activity at the GLP-1 receptor. Accordingly, in some embodiments, the peptides and variant peptides are considered as "pure glucagon receptor agonists" or are not considered as a "glucagon/GLP-1 receptor co-agonist." In some embodiments these peptides and variant peptides exhibit any of the levels of activity or potency at the glucagon receptor described herein but have substantially less activity (potency) at the GLP-1 receptor. In some embodiments, the glucagon analog exhibits an EC50 at the GLP-1 receptor which is 100-fold or greater than the EC50 at the glucagon receptor.

Agonist Activity at the GLP-1 Receptor

[0045] In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 for GLP-1 receptor activation of about 1000 μM or less (e.g., about 750 μM or less, about 500 μM or less, about 250 μM or less, about 100 μM or less, about 75 μM or less, about 50 μM or less, about 25 μM or less, about 10 μM or less, about 5 μM or less, or about 1 μM or less). In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 at the GLP-1 receptor of about 1000 nM or less (e.g., about 750 nM or less, about 500 nM or less, about 250 nM or less, about 100 nM or less, about 75 nM or less, about 50 nM or less, about 25 nM or less, about 10 nM or less, about 5 nM or less, or about 1 nM or less). In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides has an EC50 at the GLP-1 receptor which is in the picomolar range. Accordingly, in some embodiments, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 for GLP-1 receptor activation of about 1000 pM or less (e.g., about 750 pM or less, about 500 pM or less, about 250 pM or less, about 100 pM or less, about 75 pM or less, about 50 pM or less, about 25 pM or less, about 10 pM or less, about 5 pM or less, or about 1 pM or less). It is understood that a lower EC50 indicates higher activity or potency at the receptor.

[0046] In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit an EC50 at the GLP-1 receptor that is about 0.001 pM or more, about 0.01 pM or more, or about 0.1 pM or more. GLP-1 receptor activation (GLP-1 receptor activity) can be measured by *in vitro* assays measuring cAMP induction in HEK293 cells over-expressing the GLP-1 receptor, e.g.,assaying HEK293 cells co-transfected with DNA

encoding the GLP-1 receptor and a luciferase gene linked to cAMP responsive element as described in Example 2.

[0047] In some embodiments, the peptides and variant peptides of the present disclosures exhibit about 0.001% or more, about 0.01% or more, about 0.1% or more, about 0.5% or more, about 1% or more, about 5% or more, about 10% or more, about 20% or more, about 30% or more, about 40% or more, about 50% or more, about 60% or more, about 75% or more, about 100% or more, about 125% or more, about 150% or more, about 175% or more, about 200% or more, about 250% or more, about 300% or more, about 350% or more, about 400% or more, about 450% or more, or about 500% or higher activity at the GLP-1 receptor relative to native GLP-1 (GLP-1 potency). In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit about 5000% or less or about 10,000% or less activity at the GLP-1 receptor relative to native GLP-1 (GLP-1 potency).

[0048] In some embodiments, the peptides and variant peptides exhibit substantial activity (potency) at only the GLP-1 receptor and little to no activity at the glucagon receptor. In some embodiments, the peptides and variant peptides are considered as "pure GLP-1 receptor agonists" or are not considered as "glucagon/GLP-1 receptor co-agonists." In some embodiments these peptides and variant peptides exhibit any of the levels of activity or potency at the GLP-1 receptor described herein but have substantially less activity (potency) at the glucagon receptor. In some embodiments, the peptides and variant peptides exhibit an EC50 at the glucagon receptor which is 100-fold or greater than the EC50 at the GLP-1 receptor.

Agonist Activity at the GLP-1 Receptor and the Glucagon Receptor

[0049] In exemplary embodiments, the peptides and variant peptides exhibit activity at both the GLP-1 receptor and glucagon receptor and may be considered as "glucagon/GLP-1 receptor co-agonists". In exemplary embodiments, the activity (e.g., the EC50 or the relative activity or potency) of the peptides and variant peptides at the glucagon receptor is within about 50-fold, about 40-fold, about 30-fold, about 20-fold, about 10-fold, or about 5 fold different (higher or lower) from its activity (e.g., the EC50 or the relative activity or potency) at the GLP-1 receptor. In exemplary aspects, the glucagon potency of the peptide or variant peptide is within about 25-, about 20-, about 15-, about 10-, or about 5-fold different (higher or lower) from its GLP-1 potency. In

exemplary aspects, the glucagon potency of the peptide or variant peptide is within about 25-, about 20-, about 15-, about 10-, or about 5-fold lower from its GLP-1 potency.

[0050] In exemplary embodiments, the co-agonist is approximately equipotent or relatively more potent at the GLP-1 receptor than the glucagon receptor. For example, the ratio of the relative activity or the EC50 or the potency of the peptide or variant peptide at the glucagon receptor divided by the relative activity or the EC50 or potency of the peptide or variant peptide at the GLP-1 receptor is less than, or is about, X, wherein X is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, or 5. In exemplary embodiments, the ratio of the EC50 or potency or relative activity of the peptide or variant peptide at the glucagon receptor divided by the EC50 or potency or relative activity of the peptide or variant peptide at the GLP-1 receptor is about 1 and less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In exemplary embodiments, the ratio of the EC50 or potency or relative activity of the peptide or variant peptide at the GLP-1 receptor divided by the EC50 or potency or relative activity of the peptide or variant peptide at the glucagon receptor is less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In exemplary embodiments, the ratio of the glucagon potency of the peptide or variant peptide compared to the GLP-1 potency of the peptide or variant peptide is less than, or is about, Y, wherein Y is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, and 5. In exemplary embodiments, the ratio of the glucagon potency of the peptide or variant peptide compared to the GLP-1 potency of the peptide or variant peptide is less than 5 (e.g., about 4, about 3, about 2, about 1). In some embodiments, the glucagon analog has an EC50 at the glucagon receptor which is 2- to 10-fold (e.g., 2-fold, 3-fold, 4-fold, 5-fold, 6-fold, 7-fold, 8-fold, 9-fold, 10-fold) greater than the EC50 at the GLP-1 receptor.

[0051] In exemplary embodiments, the peptide is primarily a glucagon agonist and is relatively more potent at the glucagon receptor than the GLP-1 receptor (e.g. the peptide is 5 times or more potent at the glucagon receptor compared to the GLP-1 receptor). For example, the ratio of the relative activity or potency or the EC50 of the peptide or variant peptide at the GLP-1 receptor divided by the relative activity or potency or the EC50 of the peptide or variant peptide at the glucagon receptor is less than, or is about, V, wherein V is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, or 5. In some embodiments, the ratio of the GLP-1 potency of the peptide or variant peptide compared to the glucagon potency of the peptide or variant peptide is less than, or is about, W, wherein W is selected from 100, 75, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 10, and 5. In some embodiments, the peptide or variant peptide exhibits at least 0.1% (e.g., about 0.5% or more, about 1% or

more, about 5% or more, about 10% or more, or more) of the activity of native GLP-1 at the GLP-1 receptor (GLP-1 potency) and exhibits at least 0.1% (e.g., about 0.5% or more, about 1% or more, about 5% or more, about 10% or more, or more) of the activity of native glucagon at the glucagon receptor (glucagon potency).

Activity at the GIP Receptor

[0052] In addition to being active at the glucagon receptor and/or the GLP-1 receptor, the peptides and variant peptides described herein, in some aspects, exhibit low agonist activity at the GIP receptor. In such aspects, preferably such peptides and variant peptides are at least 100-fold selective for the GLP-1 receptor relative to the GIP receptor.

[0053] In other aspects, however, the peptide or variant peptide exhibits appreciable activity at the GIP receptor, e.g. the EC50 of the analog at the GIP receptor is less than about 50-fold different from its EC50 at the GLP-1 receptor, optionally, wherein the GIP potency of the analog is within about 50-fold of the GLP-1 potency of the analog. In exemplary embodiments, the peptides exhibit an EC50 for GIP receptor activation activity of about 1 μM or less, or 100 nM or less, or about 75, 50, 25, 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2 or 1 nM or less. It is understood that a lower EC50 indicates higher activity or potency at the receptor. In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit an EC50 at the GIP receptor that is about 0.001 nM, 0.01 nM, or 0.1 nM. In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit an EC50 at the GIP receptor that is no more than about 100 nM. Receptor activation can be measured by in vitro assays measuring cAMP induction in HEK293 cells over-expressing the receptor, e.g. assaying HEK293 cells co-transfected with DNA encoding the receptor and a luciferase gene linked to cAMP responsive element as described in Example 2.

[0054] In some embodiments, the presently disclosed peptides and variant peptides exhibit at least about 0.1%, 1%, 10%, 50%, 100%, 150%, or 200% or higher activity at the GIP receptor relative to native GIP (GIP potency). In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit no more than 1000%, 10,000%, 100,000%, or 1,000,000% activity at the GIP receptor relative to native GIP. A glucagon peptide's activity (potency) at a receptor relative to a native ligand of the receptor is calculated as the inverse ratio of EC50s for the peptide vs. the native ligand.

[0055] Thus, one aspect of the present disclosures provides peptides and variant peptides that exhibit activity at both the glucagon receptor and the GIP receptor ("glucagon/GIP co-agonists"). In some embodiments, the EC50 of the peptide at the GIP

receptor is less than about 50-fold, 40-fold, 30-fold or 20-fold different (higher or lower) from its EC50 at the glucagon receptor. In some embodiments, the GIP potency of the peptide is less than about 500-, 450-, 400-, 350-, 300-, 250-, 200-, 150-, 100-, 75-, 50-, 25-, 20-, 15-, 10-, or 5-fold different (higher or lower) from its glucagon potency. In some embodiments, GLP-1 activity has been significantly reduced or destroyed, e.g., by an amino acid modification at position 7, a deletion of the amino acid(s) C-terminal to the amino acid at position 27 or 28, or a combination thereof.

[0056] In alternative aspects of the present disclosures, the peptides and variant peptides of the present disclosures exhibit activity at the GLP-1 and GIP receptors, but do not exhibit significant activity at the glucagon receptor ("GIP/GLP-1 co-agonists"), e.g., due to an amino acid modification of Gln at position 3. For example, substitution at this position with an acidic, basic, or a hydrophobic amino acid (glutamic acid, ornithine, norleucine) reduces glucagon activity. In other aspects, the peptides and variant peptides exhibit activity at each of the glucagon, GIP and GLP-1 receptors ("glucagon/GIP/GLP-1 tri-agonists"). For example, in either of these latter aspects, the EC50 of the peptide at the GIP receptor is less than about 50-fold, 40-fold, 30-fold or 20-fold different (higher or lower) from its EC50 at the GLP-1 receptor. In some embodiments, the GIP potency of the peptide is less than about 25-, 20-, 15-, 10-, or 5-fold different (higher or lower) from its GLP-1 potency. In some embodiments these peptides have about 10% or less of the activity of native glucagon at the glucagon receptor, e.g. about 1-10%, or about 0.1-10%, or greater than about 0.1% but less than about 10%.

Activity of Conjugates

[0057] In some embodiments, the peptides and variant peptides described herein exhibit activity or potency at the glucagon receptor and/or activity at the GLP-1 receptor and/or activity at the GIP receptor, as described above and, when the peptide or variant peptide is part of a conjugate (e.g., is conjugated to a heterologous moiety, e.g., a hydrophilic moiety, e.g., a polyethylene glycol), the peptide or variant peptide exhibits an activity that is lower (i.e. lower potency or higher EC50) than when the peptide or variant peptide is not part of the conjugate. In some aspects, the peptide or variant peptide when not part of conjugate exhibits a potency at the glucagon receptor and/or the GLP-1 receptor that is about 10-fold or greater than the potency of the peptide or variant peptide when part of a conjugate. In some aspects, the peptide or variant peptide when unconjugated exhibits an potency at the glucagon receptor and/or GLP-1 receptor that is about 10-fold, about 15-fold, about 20-fold, about 25-fold, about 30-fold, about 35-fold,

about 40-fold, about 45-fold, about 50-fold, about 100-fold, or even greater-fold the potency of the peptide or variant peptide when conjugated.

STRUCTURE OF THE GLUCAGON ANALOGS

[0058]

Acylation

[0059] In accordance with some embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid (e.g., a non-coded acylated amino acid (e.g., an amino acid comprising an acyl group which is non-native to a naturally-occurring amino acid)). The acylated amino acid in some embodiments causes the glucagon analog to have one or more of (i) a prolonged half-life in circulation, (ii) a delayed onset of action, (iii) an extended duration of action, (iv) an improved resistance to proteases, such as DPP-IV, and (v) increased potency at one or both of the GLP-1 and glucagon receptors. As shown herein, acylated glucagon analogs do not exhibit decreased activity at the glucagon and GLP-1 receptors in comparison to the corresponding unacylated glucagon analog. Rather, in some instances, acylated glucagon analogs actually exhibit increased activity at the GLP-1 and glucagon receptors. Accordingly, the potency of the acylated glucagon analogs is comparable to the unacylated versions of the glucagon analogs, if not enhanced.

[0060] In accordance with one embodiment, the glucagon analog comprises an acyl group which is attached to the glucagon analog via an ester, thioester, or amide linkage for purposes of prolonging half-life in circulation and/or delaying the onset of and/or extending the duration of action and/or improving resistance to proteases such as DPP-IV.

[0061] Acylation can be carried out at any position within the glucagon analog, including any of positions 1-29, a position C-terminal to the 29th amino acid (e.g., the amino acid at position 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, etc., at a position within a C-terminal extension or at the C-terminus), provided that glucagon and/or GLP-1 activity is retained, if not enhanced. Nonlimiting examples include positions 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, or 29. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of: 9, 10, 12, 16, and 20. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of: 10, 12, and 16. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of: 9, 10, 12, 16, and 20. In exemplary

embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid at one or more positions 10 and 12. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid at position 12. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises a C-terminal extension and an acylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of 9, 10, 12, 16, 20, and 37-43 (e.g., 40). In specific embodiments, acylation occurs at position 10 of the glucagon analog and the glucagon analog lacks an intramolecular bridge, e.g., a covalent intramolecular bridge (e.g., a lactam bridge). Such acylated glucagon analogs lacking an intramolecular bridge demonstrate enhanced activity at the GLP-1 and glucagon receptors as compared to the corresponding non-acylated analogs lacking a covalent intramolecular bridge and in comparison to the corresponding analogs lacking an intramolecular bridge acylated at a position other than position 10. As shown herein, acylation at position 10 can even transform a glucagon analog having little activity at the glucagon receptor to a glucagon analog having activity at both the glucagon and GLP-1 receptors. Accordingly, the position at which acylation occurs can alter the overall activity profile of the glucagon analog.

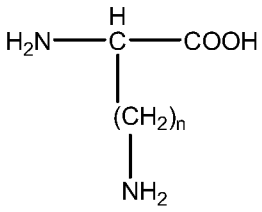
[0062] The glucagon analog in some embodiments are acylated at the same amino acid position where a hydrophilic moiety is linked, or at a different amino acid position. Nonlimiting examples include acylation at position 10 and pegylation at one or more positions in the C-terminal portion of the glucagon analog, e.g., position 24, 28 or 29, within a C-terminal extension, or at the C-terminus (e.g., through adding a C-terminal Cys).

[0063] The acyl group can be covalently linked directly to an amino acid of the glucagon analog, or indirectly to an amino acid of the glucagon analog via a spacer, wherein the spacer is positioned between the amino acid of the glucagon analog and the acyl group.

[0064] In specific aspects, the glucagon analog is modified to comprise an acyl group by direct acylation of an amine, hydroxyl, or thiol of a side chain of an amino acid of the glucagon analog. In some embodiments, acylation is at position 10, 20, 24, or 29 of the glucagon analog. In this regard, the acylated glucagon analog can comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or a modified amino acid sequence thereof comprising one or more of the amino acid modifications described herein, with at least one of the amino acids at positions 10, 20, 24, and 29 of the analog modified to any amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol. In some specific embodiments, the

direct acylation of the glucagon analog occurs through the side chain amine, hydroxyl, or thiol of the amino acid at position 10.

[0065] In some embodiments, the amino acid comprising a side chain amine is an amino acid of Formula I:

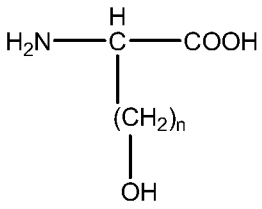


wherein n = 1 to 4

[Formula I]

In some exemplary embodiments, the amino acid of Formula I, is the amino acid wherein n is 4 (Lys) or n is 3 (Orn).

[0066] In other embodiments, the amino acid comprising a side chain hydroxyl is an amino acid of Formula II:

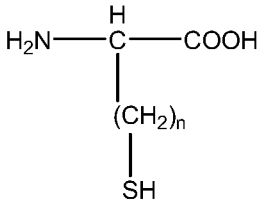


wherein n = 1 to 4

[Formula II]

In some exemplary embodiments, the amino acid of Formula II is the amino acid wherein n is 1 (Ser).

[0067] In yet other embodiments, the amino acid comprising a side chain thiol is an amino acid of Formula III:



wherein n = 1 to 4

[Formula III]

In some exemplary embodiments, the amino acid of Formula III is the amino acid wherein n is 1 (Cys).

[0068] In yet other embodiments, the amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol is a disubstituted amino acid comprising the same structure of Formula

I, Formula II, or Formula III, except that the hydrogen bonded to the alpha carbon of the amino acid of Formula I, Formula II, or Formula III is replaced with a second side chain.

[0069] In some embodiments, the acylated glucagon comprises a spacer between the analog and the acyl group. In some embodiments, the glucagon analog is covalently bound to the spacer, which is covalently bound to the acyl group.

[0070] In some embodiments, the spacer is an amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol, or a dipeptide or tripeptide comprising an amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol. The amino acid to which the spacer is attached can be any amino acid (e.g., a singly or doubly α-substituted amino acid) comprising a moiety which permits linkage to the spacer. For example, an amino acid comprising a side chain NH_2, –OH, or –COOH (e.g., Lys, Orn, Ser, Asp, or Glu) is suitable. In this respect, the acylated glucagon analog can comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, or a modified amino acid sequence thereof comprising one or more of the amino acid modifications described herein, with at least one of the amino acids at positions 10, 20, 24, and 29 modified to any amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or carboxylate.

[0071] In some embodiments, the spacer is an amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol, or a dipeptide or tripeptide comprising an amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol.

[0072] When acylation occurs through an amine group of a spacer, the acylation can occur through the alpha amine of the amino acid or a side chain amine. In the instance in which the alpha amine is acylated, the amino acid of the spacer can be any amino acid. For example, the amino acid of the spacer can be a hydrophobic amino acid, e.g., Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, 6-amino hexanoic acid, 5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid, and 8-aminooctanoic acid. Alternatively, the amino acid of the spacer can be an acidic residue, e.g., Asp, Glu, homoglutamic acid, homocysteic acid, cysteic acid, gamma-glutamic acid.

[0073] In the instance in which the side chain amine of the amino acid of the spacer is acylated, the amino acid of the spacer is an amino acid comprising a side chain amine, e.g., an amino acid of Formula I (e.g., Lys or Orn). In this instance, it is possible for both the alpha amine and the side chain amine of the amino acid of the spacer to be acylated, such that the glucagon analog is diacylated. Embodiments of the invention include such diacylated molecules.

[0074] When acylation occurs through a hydroxyl group of a spacer, the amino acid or one of the amino acids of the dipeptide or tripeptide can be an amino acid of Formula II. In a specific exemplary embodiment, the amino acid is Ser.

[0075] When acylation occurs through a thiol group of a spacer, the amino acid or one of the amino acids of the dipeptide or tripeptide can be an amino acid of Formula III. In a specific exemplary embodiment, the amino acid is Cys.

[0076] In some embodiments, the spacer is a hydrophilic bifunctional spacer. In certain embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises two or more reactive groups, e.g., an amine, a hydroxyl, a thiol, and a carboxyl group or any combinations thereof. In certain embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises a hydroxyl group and a carboxylate. In other embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises an amine group and a carboxylate. In other embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises a thiol group and a carboxylate. In a specific embodiment, the spacer comprises an amino poly(alkyloxy)carboxylate. In this regard, the spacer can comprise, for example, $NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$, wherein m is any integer from 1 to 6 and n is any integer from 2 to 12, such as, e.g., 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid, which is commercially available from Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

[0077] In some embodiments, the spacer is a hydrophobic bifunctional spacer. Hydrophobic bifunctional spacers are known in the art. See, e.g., *Bioconjugate Techniques*, G. T. Hermanson (Academic Press, San Diego, CA, 1996), which is incorporated by reference in its entirety. In certain embodiments, the hydrophobic bifunctional spacer comprises two or more reactive groups, e.g., an amine, a hydroxyl, a thiol, and a carboxyl group or any combinations thereof. In certain embodiments, the hydrophobic bifunctional spacer comprises a hydroxyl group and a carboxylate. In other embodiments, the hydrophobic bifunctional spacer comprises an amine group and a carboxylate. In other embodiments, the hydrophobic bifunctional spacer comprises a thiol group and a carboxylate. Suitable hydrophobic bifunctional spacers comprising a carboxylate and a hydroxyl group or a thiol group are known in the art and include, for example, 8-hydroxyoctanoic acid and 8-mercaptooctanoic acid.

[0078] In some embodiments, the bifunctional spacer is not a dicarboxylic acid comprising an unbranched, methylene of 1-7 carbon atoms between the carboxylate groups. In some embodiments, the bifunctional spacer is a dicarboxylic acid comprising an unbranched, methylene of 1-7 carbon atoms between the carboxylate groups.

[0079] The spacer (e.g., amino acid, dipeptide, tripeptide, hydrophilic bifunctional spacer, or hydrophobic bifunctional spacer) in specific embodiments is 3 to 10 atoms (e.g., 6 to 10 atoms, (e.g., 6, 7, 8, 9, or 10 atoms) in length. In more specific embodiments, the spacer is about 3 to 10 atoms (e.g., 6 to 10 atoms) in length and the acyl group is a C12 to C18 fatty acyl group, e.g., C14 fatty acyl group, C16 fatty acyl group, such that the total length of the spacer and acyl group is 14 to 28 atoms, e.g., about 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, or 28 atoms. In some embodiments, the length of the spacer and acyl group is 17 to 28 (e.g., 19 to 26, 19 to 21) atoms.

[0080] In accordance with certain foregoing embodiments, the bifunctional spacer can be a synthetic or naturally occurring amino acid (including, but not limited to, any of those described herein) comprising an amino acid backbone that is 3 to 10 atoms in length (e.g., 6-amino hexanoic acid, 5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid, and 8-aminooctanoic acid). Alternatively, the spacer can be a dipeptide or tripeptide spacer having a peptide backbone that is 3 to 10 atoms (e.g., 6 to 10 atoms) in length. Each amino acid of the dipeptide or tripeptide spacer can be the same as or different from the other amino acid(s) of the dipeptide or tripeptide and can be independently selected from the group consisting of: naturally-occurring or coded and/or non-coded or non-naturally occurring amino acids, including, for example, any of the D or L isomers of the naturally-occurring amino acids (Ala, Cys, Asp, Glu, Phe, Gly, His, Ile, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Arg, Ser, Thr, Val, Trp, Tyr), or any D or L isomers of the non-naturally occurring or non-coded amino acids selected from the group consisting of: β-alanine (β-Ala), N-α-methyl-alanine (Me-Ala), aminobutyric acid (Abu), γ-aminobutyric acid (γ-Abu), aminohexanoic acid (ε-Ahx), aminoisobutyric acid (Aib), aminomethylpyrrole carboxylic acid, aminopiperidinecarboxylic acid, aminoserine (Ams), aminotetrahydropyran-4-carboxylic acid, arginine N-methoxy-N-methyl amide, β-aspartic acid (β-Asp), azetidine carboxylic acid, 3-(2-benzothiazolyl)alanine, α-*tert*-butylglycine, 2-amino-5-ureido-n-valeric acid (citrulline, Cit), β-Cyclohexylalanine (Cha), acetamidomethyl-cysteine, diaminobutanoic acid (Dab), diaminopropionic acid (Dpr), dihydroxyphenylalanine (DOPA), dimethylthiazolidine (DMTA), γ-Glutamic acid (γ-Glu), homoserine (Hse), hydroxyproline (Hyp), isoleucine N-methoxy-N-methyl amide, methyl-isoleucine (MeIle), isonipecotic acid (Isn), methyl-leucine (MeLeu), methyl-lysine, dimethyl-lysine, trimethyl-lysine, methanoproline, methionine-sulfoxide (Met(O)), methionine-sulfone ($Met(O_2)$), norleucine (Nle), methyl-norleucine (Me-Nle), norvaline (Nva), ornithine (Orn), para-aminobenzoic acid (PABA), penicillamine (Pen), methylphenylalanine

(MePhe), 4-Chlorophenylalanine (Phe(4-Cl)), 4-fluorophenylalanine (Phe(4-F)), 4-nitrophenylalanine (Phe(4-NO_2)), 4-cyanophenylalanine ((Phe(4-CN)), phenylglycine (Phg), piperidinylalanine, piperidinylglycine, 3,4-dehydroproline, pyrrolidinylalanine, sarcosine (Sar), selenocysteine (Sec), O-Benzyl-phosphoserine, 4-amino-3-hydroxy-6-methylheptanoic acid (Sta), 4-amino-5-cyclohexyl-3-hydroxypentanoic acid (ACHPA), 4-amino-3-hydroxy-5-phenylpentanoic acid (AHPPA), 1,2,3,4,-tetrahydro-isoquinoline-3-carboxylic acid (Tic), tetrahydropyranglycine, thienylalanine (Thi) , O-benzyl-phosphotyrosine, O-Phosphotyrosine, methoxytyrosine, ethoxytyrosine, O-(bis-dimethylamino-phosphono)-tyrosine, tyrosine sulfate tetrabutylamine, methyl-valine (MeVal), and alkylated 3-mercaptopropionic acid.

[0081] In some embodiments, the spacer comprises an overall negative charge, e.g., comprises one or two negative- charged amino acids. In some embodiments, the dipeptide is not any of the dipeptides of general structure A-B, wherein A is selected from the group consisting of Gly, Gln, Ala, Arg, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Phe, and Pro, wherein B is selected from the group consisting of Lys, His, Trp. In some embodiments, the dipeptide spacer is selected from the group consisting of: Ala-Ala, β-Ala- β-Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, γ-aminobutyric acid- γ-aminobutyric acid, Glu-Glu, and γ-Glu- γ-Glu.

[0082] In some exemplary embodiments, the glucagon analog is modified to comprise an acyl group by acylation of an amine, hydroxyl, or thiol of a spacer, which spacer is attached to a side chain of an amino acid at position 10, 20, 24, or 29, or at the C-terminal amino acid of the glucagon analog.

[0083] In yet more specific embodiments, the acyl group is attached to the amino acid at position 10 of the glucagon analog and the length of the spacer and acyl group is 14 to 28 atoms. The amino acid at position 10, in some aspects, is an amino acid of Formula I, e.g., Lys, or a disubstituted amino acid related to Formula I. In more specific embodiments, the glucagon analog lacks an intramolecular bridge, e.g., a covalent intramolecular bridge. The glucagon analog, for example, can be a glucagon analog comprising one or more alpha, alpha-disubstituted amino acids, e.g., AIB, for stabilizing the alpha helix of the analog.

[0084] Suitable methods of peptide acylation via amines, hydroxyls, and thiols are known in the art. See, for example, Example 19 (for methods of acylating through an amine), Miller, *Biochem Biophys Res Commun* 218: 377-382 (1996); Shimohigashi and Stammer, *Int J Pept Protein Res* 19: 54-62 (1982); and Previero et al., *Biochim Biophys Acta* 263: 7-13 (1972) (for methods of acylating through a hydroxyl); and San and

Silvius, J Pept Res 66: 169-180 (2005) (for methods of acylating through a thiol); Bioconjugate Chem. "Chemical Modifications of Proteins: History and Applications" pages 1, 2-12 (1990); Hashimoto et al., Pharmacuetical Res. "Synthesis of Palmitoyl Derivatives of Insulin and their Biological Activity" Vol. 6, No: 2 pp.171-176 (1989).

[0085] The acyl group of the acylated amino acid can be of any size, e.g., any length carbon chain, and can be linear or branched. In some specific embodiments, the acyl group is a C4 to C30 fatty acid. For example, the acyl group can be any of a C4 fatty acid, C6 fatty acid, C8 fatty acid, C10 fatty acid, C12 fatty acid, C14 fatty acid, C16 fatty acid, C18 fatty acid, C20 fatty acid, C22 fatty acid, C24 fatty acid, C26 fatty acid, C28 fatty acid, or a C30 fatty acid. In some embodiments, the acyl group is a C8 to C20 fatty acid, e.g., a C14 fatty acid or a C16 fatty acid.

[0086] In an alternative embodiment, the acyl group is a bile acid. The bile acid can be any suitable bile acid, including, but not limited to, cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid, taurocholic acid, glycocholic acid, and cholesterol acid.

[0087] In some embodiments, the glucagon analog comprises an acylated amino acid by acylation of a long chain alkane by the glucagon analog. In specific aspects, the long chain alkane comprises an amine, hydroxyl, or thiol group (e.g.,octadecylamine, tetradecanol, and hexadecanethiol) which reacts with a carboxyl group, or activated form thereof, of the glucagon analog. The carboxyl group, or activated form thereof, of the glucagon analog can be part of a side chain of an amino acid (e.g., glutamic acid, aspartic acid) of the glucagon analog or can be part of the analog backbone.

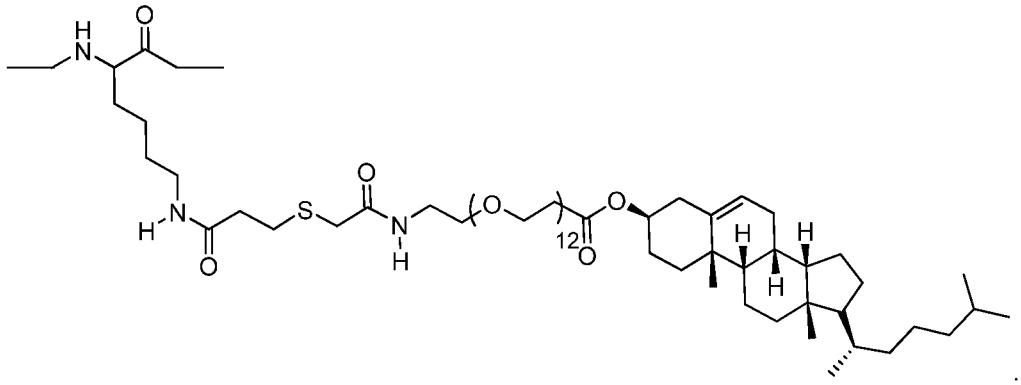
[0088] In certain embodiments, the glucagon analog is modified to comprise an acyl group by acylation of the long chain alkane by a spacer which is attached to the glucagon analog. In specific aspects, the long chain alkane comprises an amine, hydroxyl, or thiol group which reacts with a carboxyl group, or activated form thereof, of the spacer. Suitable spacers comprising a carboxyl group, or activated form thereof, are described herein and include, for example, bifunctional spacers, e.g., amino acids, dipeptides, tripeptides, hydrophilic bifunctional spacers and hydrophobic bifunctional spacers.

[0089] As used herein, the term “activated form of a carboxyl group” refers to a carboxyl group with the general formula R(C=O)X, wherein X is a leaving group and R is the glucagon analog or the spacer. For example, activated forms of a carboxyl groups may include, but are not limited to, acyl chlorides, anhydrides, and esters. In some

embodiments, the activated carboxyl group is an ester with a N-hydroxysuccinimide ester (NHS) leaving group.

[0090] With regard to these aspects, in which a long chain alkane is acylated by the glucagon analog or the spacer, the long chain alkane may be of any size and can comprise any length of carbon chain. The long chain alkane can be linear or branched. In certain aspects, the long chain alkane is a C4 to C30 alkane. For example, the long chain alkane can be any of a C4 alkane, C6 alkane, C8 alkane, C10 alkane, C12 alkane, C14 alkane, C16 alkane, C18 alkane, C20 alkane, C22 alkane, C24 alkane, C26 alkane, C28 alkane, or a C30 alkane. In some embodiments, the long chain alkane comprises a C8 to C20 alkane, e.g., a C14 alkane, C16 alkane, or a C18 alkane.

[0091] Also, in some embodiments, an amine, hydroxyl, or thiol group of the glucagon analog is acylated with a cholesterol acid. In a specific embodiment, the glucagon analog is linked to the cholesterol acid through an alkylated des-amino Cys spacer, i.e., an alkylated 3-mercaptopropionic acid spacer. The alkylated des-amino Cys spacer can be, for example, a des-amino-Cys spacer comprising a dodecaethylene glycol moiety. In one embodiment, the glucagon analog comprises the structure:



[0092] The acylated glucagon analogs described herein can be further modified to comprise a hydrophilic moiety. In some specific embodiments the hydrophilic moiety can comprise a polyethylene glycol (PEG) chain. The incorporation of a hydrophilic moiety can be accomplished through any suitable means, such as any of the methods described herein. In this regard, the acylated glucagon analog can comprise SEQ ID NO: 1, including any of the modifications described herein, in which at least one of the amino acids at position 10, 20, 24, and 29 of the analog comprises an acyl group and at least one of the amino acids at position 16, 17, 21, 24, or 29, a position within a C-terminal extension, or the C-terminal amino acid are modified to a Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the side chain of the amino acid is covalently bonded to a hydrophilic moiety (e.g., PEG). In some embodiments, the acyl group is attached to position 10, optionally

via a spacer comprising Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the hydrophilic moiety is incorporated at a Cys residue at position 24.

[0093] Alternatively, the acylated glucagon analog can comprise a spacer, wherein the spacer is both acylated and modified to comprise the hydrophilic moiety. Nonlimiting examples of suitable spacers include a spacer comprising one or more amino acids selected from the group consisting of Cys, Lys, Orn, homo-Cys, and Ac-Phe.

Alkylation

[0094] In accordance with some embodiments, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid (e.g., a non-coded alkylated amino acid (e.g., an amino acid comprising an alkyl group which is non-native to a naturally-occurring amino acid)). Without being held to any particular theory, it is believed that alkylation of glucagon analogs achieve similar, if not the same, effects as acylation of the glucagon analogs, e.g., a prolonged half-life in circulation, a delayed onset of action, an extended duration of action, an improved resistance to proteases, such as DPP-IV, and increased potency at the GLP-1 and glucagon receptors.

[0095] Alkylation can be carried out at any positions within the glucagon analog, including any of the positions described herein as a site for acylation, including but not limited to, any of amino acid positions 1-29, an amino acid position C-terminal to the 29th residue, e.g., 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, etc., at a position within a C-terminal extension, or at the C-terminus, provided that the glucagon activity or GLP-1 activity is retained. Nonlimiting examples include positions 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 27, 28, or 29. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of: 9, 10, 12, 16, and 20. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of: 10, 12, and 16. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of: 9, 10, 12, 16, and 20. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid at one or more positions 10 and 12. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid at position 12. In exemplary embodiments, the glucagon analog comprises a C-terminal extension and an alkylated amino acid at one or more positions selected from the group consisting of 9, 10, 12, 16, 20, and 37-43 (e.g., 40). The alkyl group can be covalently linked directly to an amino acid of the glucagon analog, or indirectly to an amino acid of

the glucagon analog via a spacer, wherein the spacer is positioned between the amino acid of the glucagon analog and the alkyl group. Glucagon analog may be alkylated at the same amino acid position where a hydrophilic moiety is linked, or at a different amino acid position. Nonlimiting examples include alkylation at position 10 and pegylation at one or more positions in the C-terminal portion of the glucagon analog, e.g., position 24, 28 or 29, within a C-terminal extension, or at the C-terminus (e.g., through adding a C-terminal Cys).

[0096] In specific aspects, the glucagon analog is modified to comprise an alkyl group by direct alkylation of an amine, hydroxyl, or thiol of a side chain of an amino acid of the glucagon analog. In some embodiments, alkylation is at position 10, 20, 24, or 29 of the glucagon analog. In this regard, the alkylated glucagon analog can comprise the amino acid sequence of SEQ ID NO : 2, or a modified amino acid sequence thereof comprising one or more of the amino acid modifications described herein, with at least one of the amino acids at positions 10, 20, 24, and 29 modified to any amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol. In some specific embodiments, the direct alkylation of the glucagon analog occurs through the side chain amine, hydroxyl, or thiol of the amino acid at position 10.

[0097] In some embodiments, the amino acid comprising a side chain amine is an amino acid of Formula I. In some exemplary embodiments, the amino acid of Formula I, is the amino acid wherein n is 4 (Lys) or n is 3 (Orn).

[0098] In other embodiments, the amino acid comprising a side chain hydroxyl is an amino acid of Formula II. In some exemplary embodiments, the amino acid of Formula II is the amino acid wherein n is 1 (Ser).

[0099] In yet other embodiments, the amino acid comprising a side chain thiol is an amino acid of Formula III. In some exemplary embodiments, the amino acid of Formula III is the amino acid wherein n is 1 (Cys).

[00100] In yet other embodiments, the amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol is a disubstituted amino acid comprising the same structure of Formula I, Formula II, or Formula III, except that the hydrogen bonded to the alpha carbon of the amino acid of Formula I, Formula II, or Formula III is replaced with a second side chain.

[00101] In some embodiments, the alkylated glucagon analog comprises a spacer between the analog and the alkyl group. In some embodiments, the glucagon analog is covalently bound to the spacer, which is covalently bound to the alkyl group. In some exemplary embodiments, the glucagon analog is modified to comprise an alkyl group by

alkylation of an amine, hydroxyl, or thiol of a spacer, which spacer is attached to a side chain of an amino acid at position 10, 20, 24, or 29 of the glucagon analog. The amino acid to which the spacer is attached can be any amino acid comprising a moiety which permits linkage to the spacer. For example, an amino acid comprising a side chain NH_2, –OH, or –COOH (e.g., Lys, Orn, Ser, Asp, or Glu) is suitable. In this respect, the alkylated glucagon analog can comprise a modified amino acid sequence of SEQ ID NO: 1, comprising one or more of the amino acid modifications described herein, with at least one of the amino acids at positions 10, 20, 24, and 29 modified to any amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or carboxylate.

[00102] In some embodiments, the spacer is an amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol or a dipeptide or tripeptide comprising an amino acid comprising a side chain amine, hydroxyl, or thiol.

[00103] When alkylation occurs through an amine group of a spacer, the alkylation can occur through the alpha amine of an amino acid or a side chain amine. In the instance in which the alpha amine is alkylated, the amino acid of the spacer can be any amino acid. For example, the amino acid of the spacer can be a hydrophobic amino acid, e.g., Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Trp, Met, Phe, Tyr, 6-amino hexanoic acid, 5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid, and 8-aminooctanoic acid. Alternatively, the amino acid of the spacer can be an acidic residue, e.g., Asp and Glu, provided that the alkylation occurs on the alpha amine of the acidic residue. In the instance in which the side chain amine of the amino acid of the spacer is alkylated, the amino acid of the spacer is an amino acid comprising a side chain amine, e.g., an amino acid of Formula I (e.g., Lys or Orn). In this instance, it is possible for both the alpha amine and the side chain amine of the amino acid of the spacer to be alkylated, such that the glucagon analog is dialkylated. Embodiments of the invention include such dialkylated molecules.

[00104] When alkylation occurs through a hydroxyl group of a spacer, the amino acid or one of the amino acids of the dipeptide or tripeptide can be an amino acid of Formula II. In a specific exemplary embodiment, the amino acid is Ser.

[00105] When alkylation occurs through a thiol group of spacer, the amino acid or one of the amino acids of the dipeptide or tripeptide can be an amino acid of Formula III. In a specific exemplary embodiment, the amino acid is Cys.

[00106] In some embodiments, the spacer is a hydrophilic bifunctional spacer. In certain embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises two or more reactive groups, e.g., an amine, a hydroxyl, a thiol, and a carboxyl group or any combinations

thereof. In certain embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer is comprises a hydroxyl group and a carboxylate. In other embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises an amine group and a carboxylate. In other embodiments, the hydrophilic bifunctional spacer comprises a thiol group and a carboxylate. In a specific embodiment, the spacer comprises an amino poly(alkyloxy)carboxylate. In this regard, the spacer can comprise, for example, $NH_2(CH_2CH_2O)_n(CH_2)_mCOOH$, wherein m is any integer from 1 to 6 and n is any integer from 2 to 12, such as, e.g., 8-amino-3,6-dioxaoctanoic acid, which is commercially available from Peptides International, Inc. (Louisville, KY).

[00107] In some embodiments, the spacer is a hydrophobic bifunctional spacer. In certain embodiments, the hydrophobic bifunctional spacer comprises two or more reactive groups, e.g., an amine, a hydroxyl, a thiol, and a carboxyl group or any combinations thereof. In certain embodiments, the hydrophobic bifunctional spacer comprises a hydroxyl group and a carboxylate. In other embodiments, the hydropholic bifunctional spacer comprises an amine group and a carboxylate. In other embodiments, the hydropholic bifunctional spacer comprises a thiol group and a carboxylate. Suitable hydrophobic bifunctional spacers comprising a carboxylate and a hydroxyl group or a thiol group are known in the art and include, for example, 8-hydroxyoctanoic acid and 8-mercaptooctanoic acid.

[00108] The spacer (e.g., amino acid, dipeptide, tripeptide, hydrophilic bifunctional spacer, or hydrophobic bifunctional spacer) in specific embodiments is 3 to 10 atoms (e.g., 6 to 10 atoms, (e.g., 6, 7, 8, 9, or 10 atoms)) in length. In more specific embodiments, the spacer is about 3 to 10 atoms (e.g., 6 to 10 atoms) in length and the alkyl is a C12 to C18 alkyl group, e.g., C14 alkyl group, C16 alkyl group, such that the total length of the spacer and alkyl group is 14 to 28 atoms, e.g., about 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, or 28 atoms. In some embodiments, the length of the spacer and alkyl is 17 to 28 (e.g., 19 to 26, 19 to 21) atoms.

[00109] In accordance with certain foregoing embodiments, the bifunctional spacer can be a synthetic or non-naturally occurring or non-coded amino acid comprising an amino acid backbone that is 3 to 10 atoms in length (e.g., 6-amino hexanoic acid, 5-aminovaleric acid, 7-aminoheptanoic acid, and 8-aminooctanoic acid). Alternatively, the spacer can be a dipeptide or tripeptide spacer having a peptide backbone that is 3 to 10 atoms (e.g., 6 to 10 atoms) in length. The dipeptide or tripeptide spacer can be composed of naturally-occurring or coded and/or non-coded or non-naturally occurring amino acids, including,

for example, any of the amino acids taught herein. In some embodiments, the spacer comprises an overall negative charge, e.g., comprises one or two negative- charged amino acids. In some embodiments, the dipeptide spacer is selected from the group consisting of: Ala-Ala, β-Ala- β-Ala, Leu-Leu, Pro-Pro, γ-aminobutyric acid- γ-aminobutyric acid, and γ-Glu- γ-Glu.

[00110] Suitable methods of peptide alkylation via amines, hydroxyls, and thiols are known in the art. For example, a Williamson ether synthesis can be used to form an ether linkage between a hydroxyl group of the glucagon analog and the alkyl group. Also, a nucleophilic substitution reaction of the peptide with an alkyl halide can result in any of an ether, thioether, or amino linkage.

[00111] The alkyl group of the alkylated glucagon analog can be of any size, e.g., any length carbon chain, and can be linear or branched. In some embodiments, the alkyl group is a C4 to C30 alkyl. For example, the alkyl group can be any of a C4 alkyl, C6 alkyl, C8 alkyl, C10 alkyl, C12 alkyl, C14 alkyl, C16 alkyl, C18 alkyl, C20 alkyl, C22 alkyl, C24 alkyl, C26 alkyl, C28 alkyl, or a C30 alkyl. In some embodiments, the alkyl group is a C8 to C20 alkyl, e.g., a C14 alkyl or a C16 alkyl.

[00112] In some specific embodiments, the alkyl group comprises a steroid moiety of a bile acid, e.g., cholic acid, chenodeoxycholic acid, deoxycholic acid, lithocholic acid, taurocholic acid, glycocholic acid, and cholesterol acid.

[00113] In some embodiments of the disclosure, the glucagon analog comprises an alkylated amino acid by reacting a nucleophilic, long chain alkane with the glucagon analog, wherein the glucagon analog comprises a leaving group suitable for nucleophilic substitution. In specific aspects, the nucleophilic group of the long chain alkane comprises an amine, hydroxyl, or thiol group (e.g.,octadecylamine, tetradecanol, and hexadecanethiol). The leaving group of the glucagon analog can be part of a side chain of an amino acid or can be part of the peptide backbone. Suitable leaving groups include, for example, N-hydroxysuccinimide, halogens, and sulfonate esters.

[00114] In certain embodiments, the glucagon analog is modified to comprise an alkyl group by reacting the nucleophilic, long chain alkane with a spacer which is attached to the glucagon analog, wherein the spacer comprises the leaving group. In specific aspects, the long chain alkane comprises an amine, hydroxyl, or thiol group. In certain embodiments, the spacer comprising the leaving group can be any spacer discussed herein, e.g., amino acids, dipeptides, tripeptides, hydrophilic bifunctional spacers and hydrophobic bifunctional spacers further comprising a suitable leaving group.

[00115] With regard to these aspects of the disclosure, in which a long chain alkane is alkylated by the glucagon analog or the spacer, the long chain alkane may be of any size and can comprise any length of carbon chain. The long chain alkane can be linear or branched. In certain aspects, the long chain alkane is a C4 to C30 alkane. For example, the long chain alkane can be any of a C4 alkane, C6 alkane, C8 alkane, C10 alkane, C12 alkane, C14 alkane, C16 alkane, C18 alkane, C20 alkane, C22 alkane, C24 alkane, C26 alkane, C28 alkane, or a C30 alkane. In some embodiments, the long chain alkane comprises a C8 to C20 alkane, e.g., a C14 alkane, C16 alkane, or a C18 alkane.

[00116] Also, in some embodiments, alkylation can occur between the glucagon analog and a cholesterol moiety. For example, the hydroxyl group of cholesterol can displace a leaving group on the long chain alkane to form a cholesterol-glucagon analog product.

[00117] The alkylated glucagon analogs described herein can be further modified to comprise a hydrophilic moiety. In some specific embodiments the hydrophilic moiety can comprise a polyethylene glycol (PEG) chain. The incorporation of a hydrophilic moiety can be accomplished through any suitable means, such as any of the methods described herein. In this regard, the alkylated glucagon analog can comprise a modified SEQ ID NO: 1 comprising one or more of the amino acid modifications described herein, in which at least one of the amino acids at position 10, 20, 24, and 29 comprise an alkyl group and at least one of the amino acids at position 16, 17, 21, 24, and 29, a position within a C-terminal extension or the C-terminal amino acid are modified to a Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the side chain of the amino acid is covalently bonded to a hydrophilic moiety (e.g., PEG). In some embodiments, the alkyl group is attached to position 10, optionally via a spacer comprising Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the hydrophilic moiety is incorporated at a Cys residue at position 24.

[00118] Alternatively, the alkylated glucagon analog can comprise a spacer, wherein the spacer is both alkylated and modified to comprise the hydrophilic moiety. Nonlimiting examples of suitable spacers include a spacer comprising one or more amino acids selected from the group consisting of Cys, Lys, Orn, homo-Cys, and Ac-Phe.

Stabilization of the alpha helix and alpha helix promoting amino acids

[00119] Without being bound to any particular theory, the glucagon analogs described herein comprise a helical structure, e.g., an alpha helix. In some embodiments, the glucagon analog comprises amino acids which stabilize the alpha helical structure. Accordingly, in some aspects, the glucagon analog comprises one or more alpha helix promoting amino acids. As used herein, the term "alpha helix promoting amino acid"

refers to an amino acid which provides increased stability to an alpha helix of the glucagon analog of which it is a part. Alpha helix promoting amino acids are known in the art. See, for example, Lyu et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88: 5317-5320 (1991); Branden & Tooze, *Introduction to Protein Structure*, Garland Publishing, New York, NY, 1991; Fasman, *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, ed. Fasman, Plenum, NY, 1989). Suitable alpha helix promoting amino acids for purposes herein include, but are not limited to: alanine, norvaline, norleucine, alpha aminobutyric acid, alpha-aminoisobutyric acid, leucine, isoleucine, valine, and the like. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid is any amino acid which is part of an alpha helix found in a naturally-occurring protein, e.g., Leu, Phe, Ala, Met, Gly, Ile, Ser, Asn, Glu, Asp, Lys, Arg.

[00120] In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid provides more stability to the alpha helix as compared to glycine or alanine. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid is an alpha, alpha di-substituted amino acid.

Alpha helix: Position of alpha helix promoting amino acids

[00121] In some embodiments, the glucagon analog comprises an amino acid sequence which is similar to native glucagon (SEQ ID NO: 1) and the glucagon analog comprises at least one alpha helix promoting amino acid. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid is located at any of positions 12 to 29 (according to the numbering of native glucagon (SEQ ID NO: 1). In some embodiments, the glucagon analog comprises a modified amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 and comprises at least one alpha helix promoting amino acid, e.g., at one or more of positions 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29. In some embodiments, the glucagon analog comprises an alpha helix promoting amino acid at one, two, three, or all of positions 16, 17, 20, and 21.

Alpha helix: Alpha, Alpha Di-Substituted Amino Acids

[00122] In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid is an alpha,alpha di-substituted amino acid. In specific embodiments, the alpha, alpha di-substituted amino acid comprises R^1 and R^2, each of which is bonded to the alpha carbon, wherein each of R^1 and R^2 is independently selected from the group consisting of C1-C4 alkyl, optionally substituted with a hydroxyl, amide, thiol, halo, or R^1 and R^2 together with the alpha carbon to which they are attached form a ring (e.g., a C3-C8 ring). In some embodiments, each of R^1 and R^2 is selected from the group consisting of: methyl, ethyl,

propyl, and n-butyl, or R^1 and R^2 together form a cyclooctane or cycloheptane (e.g., 1-aminocyclooctane-1-carboxylic acid). In some embodiments, R^1 and R^2 are the same. In some embodiments, R^1 is different from R^2. In certain aspects, each of R^1 and R^2 is a C1-C4 alkyl. In some aspects, each of R^1 and R^2 is a C1 or C2 alkyl. In some embodiments, each of R^1 and R^2 is methyl, such that the alpha, alpha disubstituted amino acid is alpha-aminoisobutyric acid (AIB).

[00123] In some aspects, the glucagon analogs described herein comprises one or more alpha, alpha di-substituted amino acids and the glucagon analogs specifically lack a covalent intramolecular bridge (e.g., a lactam), since the alpha, alpha disubstituted amino acid is capable of stabilizing the alpha helix in the absence of a covalent bridge. In some aspects, the glucagon analog comprises one or more alpha, alpha di-substituted amino acids at the C-terminus (around positions 12-29). In some embodiments, one, two, three, four or more of positions 16, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 28, or 29 of the glucagon analog is substituted with an α, α-disubstituted amino acid, e.g., amino iso-butyric acid (AIB), an amino acid disubstituted with the same or a different group selected from methyl, ethyl, propyl, and n-butyl, or with a cyclooctane or cycloheptane (e.g., 1-aminocyclooctane-1-carboxylic acid). For example, substitution of position 16 with AIB enhances GLP-1 activity, in the absence of an intramolecular bridge, e.g., a non-covalent intramolecular bridge (e.g., a salt bridge) or a covalent intramolecular bridge (e.g., a lactam). In some embodiments, one, two, three or more of positions 16, 20, 21 or 24 are substituted with AIB. In specific embodiments, one or both of the amino acids corresponding to positions 2, 16, of native human glucagon (SEQ ID NO: 1) are substituted with an alpha, alpha disubstituted amino acid such as AIB.

[00124] In accordance with some embodiments, the glucagon analog lacking an intramolecular bridge comprises one or more substitutions within amino acid positions 12-29 with an α, α-disubstituted amino acid and an acyl or alkyl group covalently attached to the side chain of the amino acid at position 10 of the glucagon analog. In specific embodiments, the acyl or alkyl group is not naturally occurring on an amino acid. In certain aspects, the acyl or alkyl group is non-native to the amino acid at position 10. Such acylated or alkylated glucagon peptides lacking an intramolecular bridge exhibit enhanced activity at the GLP-1 and glucagon receptors as compared to the non-acylated counterpart peptides. Further enhancement in activity at the GLP-1 and glucagon receptors can be achieved by the acylated glucagon peptides lacking an intramolecular bridge by incorporating a spacer between the acyl or alkyl group and the side chain of the

amino acid at position 10 of the analog. Acylation and alkylation, with or without incorporating spacers, are further described herein.

Alpha helix: Intramolecular Bridges

[00125] In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid is an amino acid which is linked to another amino acid of the glucagon analog via an intramolecular bridge. In such embodiments, each of these two amino acids linked via an intramolecular bridge is considered an alpha helix promoting amino acid. In some embodiments, the glucagon analog comprises one or two intramolecular bridges. In some specific embodiments, the glucagon analog comprises one intramolecular bridge in combination with at least one other alpha helix promoting amino acid, e.g., an alpha, alpha-disubstituted amino acid.

[00126] In some embodiments, the intramolecular bridge is a bridge which connects two parts of the glucagon analog via noncovalent bonds, including, for example, van der Waals interactions, hydrogen bonds, ionic bonds, hydrophobic interactions, dipole-dipole interactions, and the like. In this regard, the glucagon analog in certain aspects comprises a non-covalent intramolecular bridge. In some embodiments, the non-covalent intramolecular bridge is a salt bridge.

[00127] In some embodiments, the intramolecular bridge is a bridge which connects two parts of the analog via covalent bonds. In this regard, the glucagon analog in certain aspects comprises a covalent intramolecular bridge.

[00128] In some embodiments, the intramolecular bridge (e.g., non-covalent intramolecular bridge, covalent intramolecular bridge) is formed between two amino acids that are 3 amino acids apart, e.g., amino acids at positions i and i+4, wherein i is any integer between 12 and 25 (e.g., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, and 25). More particularly, the side chains of the amino acid pairs 12 and 16, 16 and 20 , 20 and 24 or 24 and 28 (amino acid pairs in which i = 12, 16, 20, or 24) are linked to one another and thus stabilize the glucagon alpha helix. Alternatively, i can be 17. In some specific embodiments, the glucagon analog comprises an intramolecular bridge between amino acids 17 and 21. In some specific embodiments, the glucagon analog comprises an intramolecular bridge between the amino acids at positions 16 and 20 or 12 and 16 and a second intramolecular bridge between the amino acids at positions 17 and 21. Glucagon analogs comprising one or more intramolecular bridges are contemplated herein. In

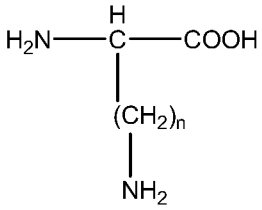
specific embodiments, wherein the amino acids at positions i and i+4 are joined by an intramolecular bridge, the size of the linker is about 8 atoms, or about 7-9 atoms.

[00129] In other embodiments, the intramolecular bridge is formed between two amino acids that are two amino acids apart, e.g., amino acids at positions j and j+3, wherein j is any integer between 12 and 26 (e.g., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, and 26). In some specific embodiments, j is 17. In specific embodiments, wherein amino acids at positions j and j+3 are joined by an intramolecular bridge, the size of the linker is about 6 atoms, or about 5 to 7 atoms.

[00130] In yet other embodiments, the intramolecular bridge is formed between two amino acids that are 6 amino acids apart, e.g., amino acids at positions k and k+7, wherein k is any integer between 12 and 22 (e.g., 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, and 22). In some specific embodiments, k is 12, 13, or 17. In an exemplary embodiment, k is 17.

Alpha helix: Amino acids involved in intramolecular bridges

[00131] Examples of amino acid pairings that are capable of bonding (covalently or non-covalently) to form a six-atom linking bridge include Orn and Asp, Glu and an amino acid of Formula I, wherein n is 2, and homoglutamic acid and an amino acid of Formula I, wherein n is 1, wherein Formula I is:



wherein n = 1 to 4

[Formula I]

[00132] Examples of amino acid pairings that are capable of bonding to form a seven-atom linking bridge include Orn-Glu (lactam ring); Lys-Asp (lactam); or Homoser-Homoglu (lactone). Examples of amino acid pairings that may form an eight-atom linker include Lys-Glu (lactam); Homolys-Asp (lactam); Orn-Homoglu (lactam); 4-aminoPhe-Asp (lactam); or Tyr-Asp (lactone). Examples of amino acid pairings that may form a nine-atom linker include Homolys-Glu (lactam); Lys-Homoglu (lactam); 4-aminoPhe-Glu (lactam); or Tyr-Glu (lactone). Any of the side chains on these amino acids may additionally be substituted with additional chemical groups, so long as the three-dimensional structure of the alpha-helix is not disrupted. One of ordinary skill in the art

can envision alternative pairings or alternative amino acid analogs, including chemically modified derivatives, that would create a stabilizing structure of similar size and desired effect. For example, a homocysteine-homocysteine disulfide bridge is 6 atoms in length and may be further modified to provide the desired effect.

[00133] Even without covalent linkage, the amino acid pairings described above (or similar pairings that one of ordinary skill in the art can envision) may also provide added stability to the alpha-helix through non-covalent bonds, for example, through formation of salt bridges or hydrogen-bonding interactions. Accordingly, salt bridges may be formed between: Orn and Glu; Lys and Asp; Homo-serine and Homo-glutamate; Lys and Glu; Asp and Arg; Homo-Lys and Asp; Orn and Homo-Glutamate; 4-aminoPhe and Asp; Tyr and Asp; Homo-Lys and Glu; Lys and Homo-Glu; 4-aminoPhe and Glu; or Tyr and Glu. In some embodiments, the analog comprises a salt bridge between any of the following pairs of amino acids: Orn and Glu; Lys and Asp; Lys and Glu; Asp and Arg; Homo-Lys and Asp; Orn and Homo-Glutamate; Homo-Lys and Glu; and Lys and Homo-Glu. Salt bridges may be formed between other pairs of oppositely charged side chains. See, e.g., Kallenbach et al., *Role of the Peptide Bond in Protein Structure and Folding*, in The Amide Linkage: Structural Significance in Chemistry, Biochemistry, and Materials Science, John Wiley & Sons, Inc. (2000).

[00134] In some embodiments, the non-covalent intramolecular bridge is a hydrophobic bridge. In accordance with one embodiment, the alpha helix of the analog is stabilized through the incorporation of hydrophobic amino acids at positions j and j+3 or i and i+4. For instance, i can be Tyr and i+4 can be either Val or Leu; i can be Phe and i+4 can be Met; or i can be Phe and i+4 can be Ile. It should be understood that, for purposes herein, the above amino acid pairings can be reversed, such that the indicated amino acid at position i could alternatively be located at i+4, while the i+4 amino acid can be located at the i position. It should also be understood that suitable amino acid pairings can be formed for j and j+3.

Alpha helix: Covalent Intramolecular Bridge

[00135] In some embodiments, the covalent intramolecular bridge is a lactam ring or lactam bridge. The size of the lactam ring can vary depending on the length of the amino acid side chains, and in one embodiment the lactam is formed by linking the side chains of an ornithine to a aspartic acid side chain. Lactam bridges and methods of making the same are known in the art. See, for example, Houston, Jr., et al., *J Peptide Sci* 1: 274-282

(2004), and Example 1 herein. In some embodiments, the analog comprises a modified sequence of SEQ ID NO: 1 and a lactam bridge between i and i+4, wherein i is as defined herein above. In some embodiments, the glucagon analog comprises two lactam bridges: one between the amino acids at positions 16 and 20 and another between the amino acids at positions 17 and 21. In some embodiments, the glucagon analog comprises one lactam bridge and one salt bridge. Further exemplary embodiments, are described herein in the section entitled "EXAMPLES." Further exemplary embodiments include the following pairings, optionally with a lactam bridge: Glu at position 12 with Lys at position 16; native Lys at position 12 with Glu at position 16; Glu at position 16 with Lys at position 20; Lys at position 16 with Glu at position 20; Glu at position 20 with Lys at position 24; Lys at position 20 with Glu at position 24; Glu at position 24 with Lys at position 28; Lys at position 24 with Glu at position 28.

[00136] In some embodiments, the covalent intramolecular bridge is a lactone. Suitable methods of making a lactone bridge are known in the art. See, for example, Sheehan et al., *J Am Chem Soc* 95: 875-879 (1973).

[00137] In some aspects, olefin metathesis is used to cross-link one or two turns of the alpha helix of the analog using an all-hydrocarbon cross-linking system. The glucagon analog in this instance comprises α-methylated amino acids bearing olefinic side chains of varying length and configured with either R or S stereochemistry at the j and j+3 or i and i+4 positions. In some embodiments, the olefinic side comprises $(CH_2)n$, wherein n is any integer between 1 to 6. In some embodiments, n is 3 for a cross-link length of 8 atoms. In some embodiments, n is 2 for a cross-link length of 6 atoms. An exemplary glucagon analog comprising an olefinic cross-link is described herein as SEQ ID NO: 17. Suitable methods of forming such intramolecular bridges are described in the art. See, for example, Schafmeister et al., *J. Am. Chem. Soc.* 122: 5891-5892 (2000) and Walensky et al., *Science* 305: 1466-1470 (2004). In alternative embodiments, the analog comprises *O*-allyl Ser residues located on adjacent helical turns, which are bridged together via ruthenium-catalyzed ring closing metathesis. Such procedures of cross-linking are described in, for example, Blackwell et al., *Angew, Chem., Int. Ed.* 37: 3281-3284 (1998).

[00138] In specific aspects, use of the unnatural thio-dialanine amino acid, lanthionine, which has been widely adopted as a peptidomimetic of cystine, is used to cross-link one turn of the alpha helix. Suitable methods of lanthionine-based cyclization are known in the art. See, for instance, Matteucci et al., *Tetrahedron* Letters 45: 1399-1401 (2004); Mayer et al., *J. Peptide Res.* 51: 432-436 (1998); Polinsky et al., *J. Med. Chem.* 35: 4185-

4194 (1992); Osapay et al., *J. Med. Chem.* 40: 2241-2251 (1997); Fukase et al., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 65: 2227-2240 (1992); Harpp et al., *J. Org. Chem.* 36: 73-80 (1971); Goodman and Shao, *Pure Appl. Chem.* 68: 1303-1308 (1996); and Osapay and Goodman, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1599-1600 (1993).

[00139] In some embodiments, α, ω-diaminoalkane tethers, e.g., 1,4-diaminopropane and 1,5-diaminopentane) between two Glu residues at positions i and i+7 are used to stabilize the alpha helix of the analog. Such tethers lead to the formation of a bridge 9-atoms or more in length, depending on the length of the diaminoalkane tether. Suitable methods of producing peptides cross-linked with such tethers are described in the art. See, for example, Phelan et al., J. Am. Chem. Soc. 119: 455-460 (1997).

[00140] In yet other embodiments, a disulfide bridge is used to cross-link one or two turns of the alpha helix of the analog. Alternatively, a modified disulfide bridge in which one or both sulfur atoms are replaced by a methylene group resulting in an isosteric macrocyclization is used to stabilize the alpha helix of the analog. Suitable methods of modifying peptides with disulfide bridges or sulfur-based cyclization are described in, for example, Jackson et al., *J. Am. Chem. Soc.* 113: 9391-9392 (1991) and Rudinger and Jost, *Experientia* 20: 570-571 (1964).

[00141] In yet other embodiments, the alpha helix of the analog is stabilized via the binding of metal atom by two His residues or a His and Cys pair positioned at j and j+3, or i and i+4. The metal atom can be, for example, Ru(III), Cu(II), Zn(II), or Cd(II). Such methods of metal binding-based alpha helix stabilization are known in the art. See, for example, Andrews and Tabor, *Tetrahedron* 55: 11711-11743 (1999); Ghadiri et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1630-1632 (1990); and Ghadiri et al., *J. Am. Chem. Soc.* 119: 9063-9064 (1997).

[00142] The alpha helix of the analog can alternatively be stabilized through other means of peptide cyclizing, which means are reviewed in Davies, J. Peptide. Sci. 9: 471-501 (2003). The alpha helix can be stabilized via the formation of an amide bridge, thioether bridge, thioester bridge, urea bridge, carbamate bridge, sulfonamide bridge, and the like. For example, a thioester bridge can be formed between the C-terminus and the side chain of a Cys residue. Alternatively, a thioester can be formed via side chains of amino acids having a thiol (Cys) and a carboxylic acid (e.g., Asp, Glu). In another method, a cross-linking agent, such as a dicarboxylic acid, e.g.,suberic acid (octanedioic

acid), etc. can introduce a link between two functional groups of an amino acid side chain, such as a free amino, hydroxyl, thiol group, and combinations thereof.

DPP-IV Resistant Peptides

[00143] In some embodiments, the glucagon analog comprises at position 1 or 2, or at both positions 1 and 2, an amino acid which achieves resistance of the glucagon analog to dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) cleavage. In some embodiments, the glucagon analog comprises at position 1 an aminio acid selected from the group consisting of: D-histidine, desaminohistidine, hydroxyl-histidine, acetyl-histidine, homo-histidine, N-methyl histidine, alpha-methyl histidine, imidazole acetic acid, or alpha, alpha-dimethyl imidiazole acetic acid (DMIA). In some embodiments, the glucagon analog comprises at position 2 an amino acid selected from the group consisting of: D-serine, D-alanine, valine, glycine, N-methyl serine, N-methyl alanine, or alpha, aminoisobutyric acid. In some embodiments, the glucagon analog comprises at position 2 an amino acid which achieves resistance of the glucagon analog to DPP IV and the amino acid which achieves resistance of the glucagon analog to DPP IV is not D-serine.

[00144] In some aspects, the glucagon analog comprising an amino acid which achieves resistance of the glucagon analog to DPP IV further comprises an amino acid modification which stabilizes the alpha helix found in the C-terminal portion of glucagon, e.g.,through a covalent bond between amino acids at positions "i" and "i+4", e.g., 12 and 16, 16 and 20, or 20 and 24. In some embodiments, this covalent bond is a lactam bridge between a glutamic acid at position 16 and a lysine at position 20. In some embodiments, this covalent bond is an intramolecular bridge other than a lactam bridge. For example, suitable covalent bonding methods include any one or more of olefin metathesis, lanthionine-based cyclization, disulfide bridge or modified sulfur-containing bridge formation, the use of α, ω-diaminoalkane tethers, the formation of metal-atom bridges, and other means of peptide cyclization.

Modification of Position 1

[00145] In some specific embodiments, the glucagon analog comprises (a) an amino acid substitution of His at position 1 with a large, aromatic amino acid and (b) an intramolecular bridge that stabilizes that alpha-helix in the C-terminal portion of the molecule (e.g.,around positions 12-29). In specific embodiments, the amino acid at position 1 is replaced with Tyr, Phe, Trp, amino-Phe, nitro-Phe, chloro-Phe, sulfo-Phe, 4-pyridyl-Ala, methyl-Tyr, or 3-amino Tyr. The intramolecular bridge, in some embodiments, is any of those described herein. In some aspects, the intramolecular

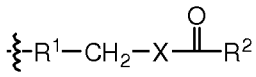
bridge is between the side chains of two amino acids that are separated by three intervening amino acids, i.e., between the side chains of amino acids i and i+4. In some embodiments, the intramolecular bridge is a lactam bridge. In some embodiments, the glucagon analog comprises a large, aromatic amino acid at position 1 and a lactam bridge between the amino acids at positions 16 and 20 of the analog. Such a glucagon analog in some aspects further comprises one or more (e.g., two, three, four, five or more) of the other modifications described herein. For example, the glucagon analog can comprise an amide in place of the C-terminal carboxylate. Also, in some embodiments, such glucagon analogs further comprise one or more of a large aliphatic amino acid at position 17, an imidazole containing amino acid at position 18, and a positive-charged amino acid at position 19. In some embodiments, the glucagon analogs comprising a modification at position 1 and an intramolecular bridge further comprises the amino acid sequence Ile-His-Gln at positions 17-19. Such modifications can be made without destroying activity of the glucagon analog at the GLP-1 receptor and the glucagon receptor. In some embodiments, the glucagon analog additionally comprises an acylated or alkylated amino acid residue.

Modification of Position 3

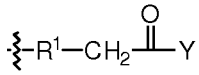
[00146] In some embodiments, the third amino acid of SEQ ID NO: 1 (Gln3) is substituted with an acidic, basic, or hydrophobic amino acid residue and such modification causes the glucagon receptor activity to be reduced. In some embodiments, the acidic, basic, or hydrophobic amino acid is glutamic acid, ornithine, norleucine. In some aspects, modification with one of these residues has led the glucagon analog to exhibit a substantially reduced or destroyed glucagon receptor activity. The glucagon analogs that are substituted with, for example, glutamic acid, ornithine, or norleucine in some aspects have about 10% or less of the activity of native glucagon at the glucagon receptor, e.g.,about 1-10%, or about 0.1-10%, or greater than about 0.1% but less than about 10%, while exhibiting at least 20% of the activity of GLP-1 at the GLP-1 receptor. In some embodiments, the glucagon analogs exhibit about 0.5%, about 1% or about 7% of the activity of native glucagon, while exhibiting at least 20% of the activity of GLP-1 at the GLP-1 receptor.

[00147] In some embodiments, the glutamine at position 3 of SEQ ID NO: 1 of the glucagon analog is substituted with a glutamine analog without a substantial loss of activity at the glucagon receptor, and in some cases, with an enhancement of glucagon receptor activity. In some embodiments, the glutamine analog is a naturally occurring or

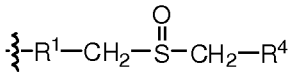
a non-naturally occurring or non-coded amino acid comprising a side chain of Structure I, II or III:



Structure I



Structure II



Structure III

wherein R^1 is C_{0-3} alkyl or C_{0-3} heteroalkyl; R^2 is NHR^4 or C_{1-3} alkyl; R^3 is C_{1-3} alkyl; R^4 is H or C_{1-3} alkyl; X is NH, O, or S; and Y is NHR^4, SR^3, or OR^3. In some embodiments, X is NH or Y is NHR^4. In some embodiments, R^1 is C_{0-2} alkyl or C_1 heteroalkyl. In some embodiments, R^2 is NHR^4 or C_1 alkyl. In some embodiments, R^4 is H or C^1 alkyl. In exemplary embodiments, an amino acid comprising a side chain of Structure I is provided where, R^1 is CH_2-S, X is NH, and R^2 is CH_3 (acetamidomethyl-cysteine, C(Acm)); R^1 is CH_2, X is NH, and R^2 is CH_3 (acetyldiaminobutanoic acid, Dab(Ac)); R^1 is C_0 alkyl, X is NH, R^2 is NHR^4, and R^4 is H (carbamoyldiaminopropanoic acid, Dap(urea)); or R^1 is CH_2-CH_2, X is NH, and R^2 is CH_3 (acetylornithine, Orn(Ac)). In exemplary embodiments, an amino acid comprising a side chain of Structure II is provide where, R^1 is CH_2, Y is NHR^4, and R^4 is CH_3 (methylglutamine, Q(Me)); In exemplary embodiments, an amino acid comprising a side chain of Structure III is provided where, R^1 is CH_2 and R^4 is H (methionine-sulfoxide, M(O)); In specific embodiments, the amino acid at position 3 is substituted with Dab(Ac) For example, glucagon agonists can comprise a modified amino acid sequence of SEQ ID NO: 595, SEQ ID NO: 601 SEQ ID NO: 603, SEQ ID NO: 604, SEQ ID NO: 605, and SEQ ID NO: 606 of the sequence listing of International Patent Application No. PCT/US2009/047438, filed on June 16, 2009, which is incorporated by reference in its entirety, wherein these amino acid sequences are modified as further described herein, e.g., modified to comprise at least three alpha helix promoting amino acids, modified to comprise (i) an acylated or alkylated amino acid at position 10, (ii) an alpha helix promoting amino acid at position 16, (iii) an aliphatic amino acid at position 17 and/or 18,

and (iv) at least one charged amino acid located C-terminal to position 27, and, optionally, further modifications; modified to comprise at least three amino acids of the amino acids 18-24 of Exendin-4 (SEQ ID NO: 8) at the corresponding positions of the glucaogon analog.

Modification of Position 7

[00148] In some embodiments, the glucagon analog comprises a modified SEQ ID NO: 1 with an amino acid modification at position 7. In some aspects, the amino acid at position 7 of SEQ ID NO: 1 (Thr) is substituted with a large, aliphatic amino acid, e.g., Ile, Leu, Ala, and the like. Such modifications are believed to drastically reduce activity at the GLP-1 receptor of the glucagon analog.

Modification of Position 15

[00149] In some embodiments, the glucagon analogs comprise a modified SEQ ID NO: 1 with an amino acid modification at position 15 which improves stability. In some aspects, the amino acid at position 15 of SEQ ID NO: 1 is deleted or substituted with glutamic acid, homoglutamic acid, cysteic acid or homocysteic acid. Such modifications reduce degradation or cleavage of the analog over time, especially in acidic or alkaline buffers, e.g., buffers at a pH within the range of 5.5 to 8. In some embodiments, the glucagon analogs comprising this modification retains at least 75%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the original analog after 24 hours at 25°C.

Modification of Position 16

[00150] In accordance with one embodiment, analogs of glucagon are provided that have enhanced potency and optionally improved solubility and stability. In one embodiment, enhanced glucagon and GLP-1 potency is provided by an amino acid modification at position 16 of native glucagon (SEQ ID NO: 1). By way of nonlimiting example, such enhanced potency can be provided by substituting the naturally occurring serine at position 16 with glutamic acid or with another negative-charged amino acid having a side chain with a length of 4 atoms, or alternatively with any one of glutamine, homoglutamic acid, or homocysteic acid, or a charged amino acid having a side chain containing at least one heteroatom, (e.g.,N, O, S, P) and with a side chain length of about 4 (or 3-5) atoms. In some embodiments, the glucagon analog comprises a modified SEQ ID NO: 1 comprising a substitution of the Ser at position 16 with an amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, glutamine, homoglutamic acid, homocysteic acid, threonine or glycine. In some aspects, the serine residue at position 16 is substituted with an amino acid selected from the group consisting of glutamic acid, glutamine,

homoglutamic acid and homocysteic acid. In some specific aspects, the serine residue at position 16 is substituted with glutamic acid or a conservative substitution thereof (e.g. an Exendin-4 amino acid).

[00151] In alternative embodiments, the glucagon analog comprises a modified sequence of SEQ ID NO: 1 modified by a substitution of Ser at position 16 with Thr or AIB or another alpha helix promoting amino acid as described above. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid forms a non-covalent intramolecular bridge with an amino acid at j+3 or i+4.

Modification at positions 17-18

[00152] In some embodiments, the glucagon analog comprises a modified SEQ ID NO: 1 in which the dibasic Arg-Arg site at positions 17 and 18 is eliminated. Without being bound to any particular theory, it is believed that elimination of the dibasic site in some embodiments improves the in vivo efficacy of the glucagon analog. In some aspects, the glucagon analog is modified in this regard by substituting one or both of the amino acids at positions 17 and 18 of SEQ ID NO: 1 with an amino acid which is not basic, e.g., with an aliphatic amino acid. In some embodiments, one of the amino acids at position 17 or 18 is deleted or an amino acid is inserted in between positions 17 and 18. In some embodiments, the Arg at position 17 is substituted with another amino acid as described herein, e.g., Gln, an amino acid comprising a hydrophilic moiety, an alpha helix promoting amino acid. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid forms a non-covalent intramolecular bridge with an amino acid at j+3 or i+4. In some embodiments, the Arg at position 18 is substituted with another amino acid as described herein. In exemplary aspects, the amino acid at position 18 is an alpha, alpha, disubstituted amino acid, e.g., AIB. In some aspects, the amino acid at position 18 is a small aliphatic amino acid, e.g., Ala. In some specific aspects, the amino acid at position 18 is a small aliphatic amino acid, e.g., Ala, and the Arg at position 17 remains unmodified.

Modification of Position 20

[00153] Enhanced activity at the GLP-1 receptor is also provided by an amino acid modification at position 20. In some embodiments, the glutamine at position 20 is replaced with an alpha helix promoting amino acid, e.g. AIB, as described above. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid forms a non-covalent intramolecular bridge with an amino acid at j-3 or i-4. In some specific embodiments the amino acid is a hydrophilic amino acid having a side chain that is either charged or has an

ability to hydrogen-bond, and is at least about 5 (or about 4-6) atoms in length, for example, lysine, citrulline, arginine, or ornithine, and optionally forms a salt bridge with another alpha helix promiting amino acid at position 16, e.g. a negative charged amino acid. Such modifications in some particular aspects reduce degradation that occurs through deamidation of Gln and in some embodiments, increase the activity of the glucagon analog at the GLP-1 receptor. In some aspects, the amino acid at position 20 is Glu or Lys or AIB.

Modification at Positions 21, 23, 24, and 28

[00154] In some embodiments, position 21 and/or position 24 is modified by substitution with an alpha helix promoting amino acid. In some embodiments, the alpha helix promoting amino acid forms a non-covalent intramolecular bridge with an amino acid at j-3 or i-4. In some aspects, the alpha helix promoting amino acid is AIB.

[00155] In exemplary embodiments, the amino acid at position 23 is a Ile.

[00156] In exemplary aspects, the amino acid at position 28 is an alpha, alpha, disubstituted amino acid, e.g., AIB.

[00157] *Charged C-terminus*

[00158] In some embodiments, the glucagon analog is modified by amino acid substitutions and/or additions that introduce a charged amino acid into the C-terminal portion of the analog. In some embodiments, such modifications enhance stability and solubility. As used herein the term "charged amino acid" or "charged residue" refers to an amino acid that comprises a side chain that is negative-charged (i.e., de-protonated) or positive-charged (i.e., protonated) in aqueous solution at physiological pH. In some aspects, these amino acid substitutions and/or additions that introduce a charged amino acid modifications are at a position C-terminal to position 27 of SEQ ID NO: 1. In some embodiments, one, two or three (and in some instances, more than three) charged amino acids are introduced within the C-terminal portion (e.g., position(s) C-terminal to position 27). In accordance with some embodiments, the native amino acid(s) at positions 28 and/or 29 are substituted with a charged amino acids, and/or in a further embodiment one to three charged amino acids are also added to the C-terminus of the analog. In exemplary embodiments, one, two or all of the charged amino acids are negative-charged. The negative-charged amino acid in some embodiments is aspartic acid, glutamic acid, cysteic acid, homocysteic acid, or homoglutamic acid. In some aspects, these modifications increase solubility, e.g.,provide at least 2-fold, 5-fold, 10-fold, 15-fold, 25-

fold, 30-fold or greater solubility relative to native glucagon at a given pH between about 5.5 and 8, e.g., pH 7, when measured after 24 hours at 25◦C.

C-terminal truncation

[00159] In accordance with some embodiments, the glucagon analogs disclosed herein are modified by truncation of the C-terminus by one or two amino acid residues. Such modified glucagon peptides, as shown herein, retain similar activity and potency at the glucagon receptor and GLP-1 receptor. In this regard, the glucagon peptides can comprise amino acids 1-27 or 1-28 of the native glucagon analog (SEQ ID NO: 1), optionally with any of the additional modifications described herein.

Charge-neutral C-terminus

[00160] In some embodiments, the glucagon analog comprises a modified SEQ ID NO: 1 in which the the carboxylic acid of the C-terminal amino acid is replaced with a charge-neutral group, such as an amide or ester. Without being bound to any particular theory, such modifications in certain aspects increases activity of the glucagon analog at the GLP-1 receptor. Accordingly, in some embodiments, the glucagon analog is an amidated peptide, such that the C-terminal residue comprises an amide in place of the alpha carboxylate of an amino acid. As used herein a general reference to a peptide or analog is intended to encompass peptides that have a modified amino terminus, carboxy terminus, orboth amino and carboxy termini. For example, an amino acid chain composing an amide group in place of the terminal carboxylic acid is intended to be encompassed by an amino acid sequence designating the standard amino acids.

Other modifications

[00161] In some embodiments, the glucagon analogs additionally or alternatively comprise the following amino acid modifications:

(i) Substitution of Ser at position 2 with Ala;

(ii) Substitution of Tyr at position 10 with Val or Phe, or Trp;

(iii) Substitution of Lys at position 12 with Arg;

(iv) Substitution of Arg at position 17 with Gln or a small aliphatic amino acid, e.g., Ala, or a large aliphatic amino acid, e.g., Ile;

(v) Substitution of Arg at position 18 with a small aliphatic amino acid, e.g., Ala; or an imidazole-containing amino acid, e.g., His;

(vi) Substitution of Ala at position 19 with a positive-charged amino acid, e.g., Gln;

(vii) Substitution of Val at position 23 with Ile, and

(viii) Substitution of Thr at position 29 with Gly or Gln.

[00162] In some embodiments, the stability of the glucagon analog is increased by modification of the methionine at position 27, for example, by substitution with leucine or norleucine. Such modifications can reduce oxidative degradation. Stability can also be increased by modification of the Gln at position 20 or 24 or 28, e.g.,by substitution with Ala, Ser, Thr, or AIB. Such modifications can reduce degradation that occurs through deamidation of Gln. Stability can be increased by modification of Asp at position 21, e.g.,by substitution with another acidic residue, e.g., Glu. Such modifications can reduce degradation that occurs through dehydration of Asp to form a cyclic succinimide intermediate followed by isomerization to iso-aspartate.

[00163] In some embodiments, the glucagon analogs described herein are glycosylated, amidated, carboxylated, phosphorylated, esterified, N-acylated, cyclized via, e.g., a disulfide bridge, or converted into a salt (e.g., an acid addition salt, a basic addition salt), and/or optionally dimerized, multimerized, or polymerized, or conjugated.

[00164] Any of the modifications described herein, including, for example, the modifications which increase or decrease glucagon receptor activity and which increase GLP-1 receptor activity, can be applied individually or in combination. Combinations of the modifications that increase GLP-1 receptor activity may provide higher GLP-1 activity than any of such modifications taken alone.

EXEMPLARY EMBODIMENTS

[00165] The present disclosures provide peptides comprising a structure similar to that of native human glucaon and exhibiting enhanced agonist activity at the GLP-1 receptor, compared to native human glucagon. Glucagon normally has about 1% of the activity of native-GLP-1 at the GLP-1 receptor, while GLP-1 normally has less than about 0.01% of the activity of native glucagon at the glucagon receptor. Accordingly, the peptides of the present disclosures exhibit greater than 1% of the activity of native-GLP-1 at the GLP-1 receptor. In exemplary embodiments, the peptides of the present disclosures exhibit

greater than or about 5%, greater than or about 10%, greater than or about 15%, greater than or about 20%, greater than or about 25%, greater than or about 30%, greater than or about 35%, greater than or about 40%, greater than or about 45%, greater than or about 50%, greater than or about 55%, greater than or about 60%, greater than or about 65%, greater than or about 70%, greater than or about75%, greater than or about 80%, greater than or about 85%, greater than or about 90%, or greater than or about 95% of the activity of native-GLP-1 at the GLP-1 receptor. In exemplary aspects, the peptides of the present disclosures exhibit activity at the GLP-1 receptor which is greater than that of native GLP-1. Accordingly, in exemplary aspects, the peptides of the present disclosures exhibit greater than or about 100% of the activity of native-GLP-1 at the GLP-1 receptor. In exemplary aspects, the peptides of the present disclosures exhibit greater than or about 150%, greater than or about 200%, greater than or about 250%, greater than or about 300%, greater than or about 350%, greater than or about 400%, greater than or about 450%, greater than or about 500%, greater than or about 550%, greater than or about 600%, greater than or about 650%, greater than or about 700%, greater than or about 750%, greater than or about 800%, greater than or about 850%, greater than or about 900%, greater than or about 950%, or greater than or about 1000% of the activity of native-GLP-1 at the GLP-1 receptor.

[00166] In exemplary embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12.

[00167] In exemplary embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13.

[00168] In exemplary embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14.

[00169] In exemplary embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15.

[00170] In exemplary embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16 and exhibits at least 100-fold selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor.

[00171] In exemplary embodiments, the peptide comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17.

[00172] The present disclosures further provides variant peptides comprising an amino acid sequence which is highly similar to the amino acid sequence of one of the presently disclosed peptides. In exemplary embodiments, the variant peptide of the present

disclosures comprises an amino acid sequence that is at least 80%, 85%, 90% or 95% identical to amino acids 1-29 of the amino acid sequence of the peptide of any of SEQ ID NOs: 12-17, wherein the variant peptide retains the activity of the parent peptide at the GLP-1 receptor, glucagon receptor, and GIP receptor (e.g., exhibits at least 100-fold selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor), and optionally a GLP-1 potency of at least 1%; or wherein the EC50 of the peptide at the GIP receptor is less than 100-fold different from its EC50 at the GLP-1 receptor). In exemplary embodiments, the variant peptide of the present disclosures comprises exhibits at least 100-fold greater selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor.

[00173] In exemplary embodiments, the variant peptide of the present disclosures comprises an amino acid sequence based on an amino acid sequence of a peptide of the present disclosures but differs at one or more amino acid positions, including, but not limited to position 1, position 2, position 3, position 7, position 10, position 12, position 15, position 16, position 17, position 18, position 20, position 21, position 23, position 24, position 27, position 28, position 29. In exemplary aspects, the variant peptide may comprise a conservative substitution relative to the parent peptide, may comprise any of the amino acid modifications described herein, or may comprise an amino acid modification that returns to the amino acid present at that position in the native glucagon sequence (SEQ ID NO: 1). In exemplary aspects, the variant peptide of the present disclosures comprises an amino acid sequence based on an amino acid sequence of a peptide of the present disclosures but differs in one or more of the following ways:

a) the variant peptide comprises an acylated amino acid or an alkylated amino acid;

b) an acylated amino acid or an alkylated amino acid is replaced with the corresponding amino acid of native glucagon (SEQ ID NO: 1) at that position or a conservative substitution of the native amino acid, and optionally a new acylated or alkylated amino acid is introduced at a different position;

c) the variant peptide comprises an amino acid covalently attached to a hydrophilic moiety;

d) an amino acid covalently attached to a hydrophilic moiety is replaced with the corresponding amino acid of native glucagon (SEQ ID NO: 1) at that position, and optionally a new amino acid

covalently attached to a hydrophilic moiety is introduced at a different position;

e) the C-terminal amino acid of the variant peptide comprises a C-terminal amide in place of a C-terminal alpha carboxylate;

f) an amino acid at any of positions 1 through 29 is replaced with the corresponding amino acid of native glucagon (SEQ ID NO: 1) at that position;

g) or any combinations thereof.

[00174] With regard to any of the foregoing variant peptides, in exemplary embodiments, the variant peptide comprises a hydrophilic moiety covalently attached to an amino acid at position 16, 17, 21, 24, 29, a position within a C-terminal extension, or at the C-terminus. In exemplary aspects, the variant peptide comprises a Cys, Lys, Orn, homocysteine, and Ac-Phe covalently attached to a hydrophilic moiety , optionally, wherein the Cys, Lys, Orn, homocysteine, or Ac-Phe is located at position 16, 17, 21, 24, 29, a position within a C-terminal extension, or at the C-terminus of the variant peptide. In exemplary aspects, the hydrophilic moiety is a polyethylene glycol.

[00175] In exemplary aspects, the variant peptide comprises an acylated or alkylated amino acid, optionally, at position 10. In exemplary aspects, the variant peptide comprises an acylated or alkylated amino acid which comprises a C8 to C20 alkyl chain, a C12 to C18 alkyl chain, or a C14 or C16 alkyl chain. In exemplary aspects, the vrariant peptide comprises an acylated or alkylated amino acid which an acylated or alkylated amino acid of Formula I, Formula II, or Formula III, optionally, wherein the amino acid of Formula I is Lys.

[00176] In exemplary aspects, the variant peptide of the present disclosures comprises an acylated or alkylated amino acid, wherein the acyl group or alkyl group is covalently attached to the amino acid via a spacer, optionally, wherein the spacer is an amino acid or a dipeptide. In exemplary embodiments, the spacer comprises one or two acidic residues.

[00177] In any of the foregoing exemplary embodiments, the peptide or variant peptide of any of the present disclosures exhibits an (EC50 at the glucagon receptor)/(EC50 at the GLP-1 receptor) is about 20 or less (e.g., 20, 19, 18, 17,. 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.10, 0. 05, 0. 025, 0. 01, 0.001).

[00178] In any of the foregoing exemplary embodiments, the peptide or variant peptide of any of the present disclosures exhibits an (EC50 at the glucagon receptor)/(EC50 at the GLP-1 receptor) is more than 20 (e.g., 21, 25, 30, 40, 50 , 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750, 1000, or more).

[00179] In any of the foregoing exemplary embodiments, the peptide or variant peptide of any of the present disclosures exhibits an EC50 at the GLP-1 receptor which is two- to ten-fold (e.g., 3-, 4-, 5-, 6-, 7-, 8-, 9-fold) greater than the EC50 at the glucagon receptor.

EXCLUSIONS

[00180] In exemplary embodiments, any one of the following peptides is excluded from the glucagon analogs described herein, although any of the following peptides comprising one or more further modifications thereto as described herein exhibiting the desired GLP-1 or co-agonist activity, pharmaceutical compositions, kits, and treatment methods using such compounds may be included in the invention: The peptide of SEQ ID NO: 1 with an [Arg12] substitution and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Arg12,Lys20] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Arg12,Lys24] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Arg12,Lys29] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with a [Glu9] substitution; The peptide of SEQ ID NO: 1 missing His1, with [Glu9, Glu16, Lys29] substitutions and C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Glu9, Glu16, Lys29] substitutions and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Lys13, Glu17] substitutions linked via lactam bridge and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 with [Lys17, Glu21] substitutions linked via lactam bridge and with a C-terminal amide; The peptide of SEQ ID NO: 1 missing His1, with [Glu20, Lys24] substitutions linked via lactam bridge. In some embodiments, the glucagon analog is not any of the peptides disclosed in any of International Patent Application No. PCT/US2009/034448, filed on February 19, 2009, and published on August 26, 2010, as WO 2010/096052; International Patent Application No. PCT/US2009/068678, filed on December 18, 2009, and published on August 26, 2010, as WO 2010/096142; International Patent Application No. PCT/US2009/047438, filed on June 16, 2009, and published on December 23, 2009 as WO 2009/155258; International Patent Application No. PCT/US2008/053857, filed on February 13, 2008, and published on August 21, 2008, as WO 2008/101017; International Patent Application No. PCT/US2010/059724, filed on December 9, 2010; International Patent Application No. PCT/US2009/047447, filed on June 16, 2009, and published on January 28, 2010, as

WO2010/011439; International Patent Application No. PCT/US2010/38825, filed on June 16, 2010, and published on December 23, 2010, as WO2010/148089; International Patent Application No. PCT/US2011/022608, filed on January 26, 2011; and U.S. Provisional Application No. 61/426,285, filed on December 22, 2010; each of which are incorporated by reference in their entirety. In some embodiments, the glucagon analog does not include all or part of the sequence KRNRNNIA linked to the C-terminus after position 29, e.g. KRNR.

METHODS OF MAKING PEPTIDES

[00181] The glucagon analogs of the disclosure can be obtained by methods known in the art. Suitable methods of de novo synthesizing peptides are described in, for example, Chan et al., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; and U.S. Patent No. 5,449,752.

[00182] Also, in the instances in which the analogs of the disclosure do not comprise any non-coded or non-natural amino acids, the glucagon analog can be recombinantly produced using a nucleic acid encoding the amino acid sequence of the analog using standard recombinant methods. See, for instance, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; and Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

[00183] In some embodiments, the glucagon analogs of the disclosure are isolated. In some embodiments, the glucagon analogs of the disclosure are purified. . It is recognized that "purity" is a relative term, and not to be necessarily construed as absolute purity or absolute enrichment or absolute selection. In some aspects, the purity is at least or about 50%, is at least or about 60%, at least or about 70%, at least or about 80%, or at least or about 90% (e.g., at least or about 91%, at least or about 92%, at least or about 93%, at least or about 94%, at least or about 95%, at least or about 96%, at least or about 97%, at least or about 98%, at least or about 99% or is approximately 100%.

[00184] In some embodiments, the peptides described herein are commercially synthesized by companies, such as Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), and Multiple Peptide Systems (San Diego, CA). In this respect, the peptides can be synthetic, recombinant, isolated, and/or purified.

CONJUGATES

[00185] The invention further provides conjugates comprising one or more of the glucagon analogs described herein conjugated to a heterologous moiety,wherein the conjugate exhibits enhanced activity at the GLP-1 receptor, as compared to native glucagon, and exhibits at least 100-fold greater selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor. As used herein, the term "heterologous moiety" is synonymous with the term "conjugate moiety" and refers to any molecule (chemical or biochemical, naturally-occurring or non-coded) which is different from the glucagon analogs described herein. Exemplary conjugate moieties that can be linked to any of the analogs described herein include but are not limited to a heterologous peptide or polypeptide (including for example, a plasma protein), a targeting agent, an immunoglobulin or portion thereof (e.g.,variable region, CDR, or Fc region), a diagnostic label such as a radioisotope, fluorophore or enzymatic label, a polymer including water soluble polymers, or other therapeutic or diagnostic agents. In some embodiments a conjugate is provided comprising an analog of the present invention and a plasma protein, wherein the plasma protein is selected from the group consisting of albumin, transferin, fibrinogen and globulins. In some embodiments the plasma protein moiety of the conjugate is albumin or transferin. The conjugate in some embodiments comprises one or more of the glucagon analogs described herein and one or more of: a peptide (which is distinct from the glucagon and/or GLP-1 receptor active glucagon analogs described herein), a polypeptide, a nucleic acid molecule, an antibody or fragment thereof, a polymer, a quantum dot, a small molecule, a toxin, a diagnostic agent, a carbohydrate, an amino acid.

[00186] In some embodiments, the heterologous moiety is a peptide which is distinct from the glucagon and/or GLP-1 receptor active analogs described herein and the conjugate is a fusion peptide or a chimeric peptide. In some embodiments, the heterologous moiety is a peptide extension of 1-21 amino acids. In specific embodiments, the extension is attached to the C-terminus of the glucagon analog, e.g., to amino acid at position 29.

[00187] In some specific aspects, the extension is a single amino acid or dipeptide. In specific embodiments, the extension comprises an amino acid selected from the group consisting of: a charged amino acid (e.g., a negative-charged amino acid (e.g., Glu), a positive-charged amino acid), an amino acid comprising a hydrophilic moiety. In some aspects, the extension is Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu.

[00188] In some embodiments, the extension comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO: 9 (GPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 10 (GGPSSGAPPPS), SEQ ID NO: 8

(KRNRNNIA), or SEQ ID NO: 11 (KRNR). In specific aspects, the amino acid sequence is attached through the C-terminal amino acid of the glucagon analog, e.g., amino acid at position 29. In some embodiments, the amino acid sequence of SEQ ID NOs: 13-16 is bound to amino acid 29 of the glucagon analog through a peptide bond. In some specific embodiments, the amino acid at position 29 of the glucagon analog is a Gly and the Gly is fused to one of the amino acid sequences of SEQ ID NOs: 8-11.

[00189] In some embodiments, the heterologous moiety is a polymer. In some embodiments, the polymer is selected from the group consisting of: polyamides, polycarbonates, polyalkylenes and derivatives thereof including, polyalkylene glycols, polyalkylene oxides, polyalkylene terepthalates, polymers of acrylic and methacrylic esters, including poly(methyl methacrylate), poly(ethyl methacrylate), poly(butylmethacrylate), poly(isobutyl methacrylate), poly(hexylmethacrylate), poly(isodecyl methacrylate), poly(lauryl methacrylate), poly(phenyl methacrylate), poly(methyl acrylate), poly(isopropyl acrylate), poly(isobutyl acrylate), and poly(octadecyl acrylate), polyvinyl polymers including polyvinyl alcohols, polyvinyl ethers, polyvinyl esters, polyvinyl halides, poly(vinyl acetate), and polyvinylpyrrolidone, polyglycolides, polysiloxanes, polyurethanes and co-polymers thereof, celluloses including alkyl cellulose, hydroxyalkyl celluloses, cellulose ethers, cellulose esters, nitro celluloses, methyl cellulose, ethyl cellulose, hydroxypropyl cellulose, hydroxy-propyl methyl cellulose, hydroxybutyl methyl cellulose, cellulose acetate, cellulose propionate, cellulose acetate butyrate, cellulose acetate phthalate, carboxylethyl cellulose, cellulose triacetate, and cellulose sulphate sodium salt, polypropylene, polyethylenes including poly(ethylene glycol), poly(ethylene oxide), and poly(ethylene terephthalate), and polystyrene.

[00190] In some aspects, the polymer is a biodegradable polymer, including a synthetic biodegradable polymer (e.g., polymers of lactic acid and glycolic acid, polyanhydrides, poly(ortho)esters, polyurethanes, poly(butic acid), poly(valeric acid), and poly(lactide-cocaprolactone)), and a natural biodegradable polymer (e.g., alginate and other polysaccharides including dextran and cellulose, collagen, chemical derivatives thereof (substitutions, additions of chemical groups, for example, alkyl, alkylene, hydroxylations, oxidations, and other modifications routinely made by those skilled in the art), albumin and other hydrophilic proteins (e.g., zein and other prolamines and hydrophobic proteins)), as well as any copolymer or mixture thereof. In general, these materials

degrade either by enzymatic hydrolysis or exposure to water *in vivo*, by surface or bulk erosion.

[00191] In some aspects, the polymer is a bioadhesive polymer, such as a bioerodible hydrogel described by H. S. Sawhney, C. P. Pathak and J. A. Hubbell in Macromolecules, 1993, 26, 581-587, the teachings of which are incorporated herein, polyhyaluronic acids, casein, gelatin, glutin, polyanhydrides, polyacrylic acid, alginate, chitosan, poly(methyl methacrylates), poly(ethyl methacrylates), poly(butylmethacrylate), poly(isobutyl methacrylate), poly(hexylmethacrylate), poly(isodecyl methacrylate), poly(lauryl methacrylate), poly(phenyl methacrylate), poly(methyl acrylate), poly(isopropyl acrylate), poly(isobutyl acrylate), and poly(octadecyl acrylate).

[00192] In some embodiments, the polymer is a water-soluble polymer or a hydrophilic polymer. Hydrophilic polymers are further described herein under "Hydrophilic Moieties." Suitable water-soluble polymers are known in the art and include, for example, polyvinylpyrrolidone, hydroxypropyl cellulose (HPC; Klucel), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC; Methocel), nitrocellulose, hydroxypropyl ethylcellulose, hydroxypropyl butylcellulose, hydroxypropyl pentylcellulose, methyl cellulose, ethylcellulose (Ethocel), hydroxyethyl cellulose, various alkyl celluloses and hydroxyalkyl celluloses, various cellulose ethers, cellulose acetate, carboxymethyl cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, calcium carboxymethyl cellulose, vinyl acetate/crotonic acid copolymers, poly-hydroxyalkyl methacrylate, hydroxymethyl methacrylate, methacrylic acid copolymers, polymethacrylic acid, polymethylmethacrylate, maleic anhydride/methyl vinyl ether copolymers, poly vinyl alcohol, sodium and calcium polyacrylic acid, polyacrylic acid, acidic carboxy polymers, carboxypolymethylene, carboxyvinyl polymers, polyoxyethylene polyoxypropylene copolymer, polymethylvinylether co-maleic anhydride, carboxymethylamide, potassium methacrylate divinylbenzene co-polymer, polyoxyethyleneglycols, polyethylene oxide, and derivatives, salts, and combinations thereof.

[00193] In specific embodiments, the polymer is a polyalkylene glycol, including, for example, polyethylene glycol (PEG).

[00194] In some embodiments, the heterologous moiety is a carbohydrate. In some embodiments, the carbohydrate is a monosaccharide (e.g., glucose, galactose, fructose), a disaccharide (e.g., sucrose, lactose, maltose), an oligosaccharide (e.g., raffinose, stachyose), a polysaccharide (a starch, amylase, amylopectin, cellulose, chitin, callose, laminarin, xylan, mannan, fucoidan, galactomannan.

[00195] In some embodiments, the heterologous moiety is a lipid. The lipid, in some embodiments, is a fatty acid, eicosanoid, prostaglandin, leukotriene, thromboxane, N-acyl ethanolamine), glycerolipid (e.g., mono-, di-, tri-substituted glycerols), glycerophospholipid (e.g., phosphatidylcholine, phosphatidylinositol, phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine), sphingolipid (e.g., sphingosine, ceramide), sterol lipid (e.g., steroid, cholesterol), prenol lipid, saccharolipid, or a polyketide, oil, wax, cholesterol, sterol, fat-soluble vitamin, monoglyceride, diglyceride, triglyceride, a phospholipid.

[00196] In some embodiments, the heterologous moiety is attached via non-covalent or covalent bonding to the analog of the present disclosure. In certain aspects, the heterologous moiety is attached to the analog of the present disclosure via a linker. Linkage can be accomplished by covalent chemical bonds, physical forces such electrostatic, hydrogen, ionic, van der Waals, or hydrophobic or hydrophilic interactions. A variety of non-covalent coupling systems may be used, including biotin-avidin, ligand/receptor, enzyme/substrate, nucleic acid/nucleic acid binding protein, lipid/lipid binding protein, cellular adhesion molecule partners; or any binding partners or fragments thereof which have affinity for each other.

[00197] The glucagon analog in some embodiments is linked to conjugate moieties via direct covalent linkage by reacting targeted amino acid residues of the analog with an organic derivatizing agent that is capable of reacting with selected side chains or the N- or C-terminal residues of these targeted amino acids. Reactive groups on the analog or conjugate moiety include, e.g., an aldehyde, amino, ester, thiol, α-haloacetyl, maleimido or hydrazino group. Derivatizing agents include, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride or other agents known in the art. Alternatively, the conjugate moieties can be linked to the analog indirectly through intermediate carriers, such as polysaccharide or polypeptide carriers. Examples of polysaccharide carriers include aminodextran. Examples of suitable polypeptide carriers include polylysine, polyglutamic acid, polyaspartic acid, co-polymers thereof, and mixed polymers of these amino acids and others, e.g., serines, to confer desirable solubility properties on the resultant loaded carrier.

[00198] Cysteinyl residues are most commonly reacted with α-haloacetates (and corresponding amines), such as chloroacetic acid, chloroacetamide to give carboxymethyl or carboxyamidomethyl derivatives. Cysteinyl residues also are derivatized by reaction

with bromotrifluoroacetone, alpha-bromo-β-(5-imidozoyl)propionic acid, chloroacetyl phosphate, N-alkylmaleimides, 3-nitro-2-pyridyl disulfide, methyl 2-pyridyl disulfide, p-chloromercuribenzoate, 2-chloromercuri-4-nitrophenol, or chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole.

[00199] Histidyl residues are derivatized by reaction with diethylpyrocarbonate at pH 5.5-7.0 because this agent is relatively specific for the histidyl side chain. Para-bromophenacyl bromide also is useful; the reaction is preferably performed in 0.1 M sodium cacodylate at pH 6.0.

[00200] Lysinyl and amino-terminal residues are reacted with succinic or other carboxylic acid anhydrides. Derivatization with these agents has the effect of reversing the charge of the lysinyl residues. Other suitable reagents for derivatizing alpha-amino-containing residues include imidoesters such as methyl picolinimidate, pyridoxal phosphate, pyridoxal, chloroborohydride, trinitrobenzenesulfonic acid, O-methylisourea, 2,4-pentanedione, and transaminase-catalyzed reaction with glyoxylate.

[00201] Arginyl residues are modified by reaction with one or several conventional reagents, among them phenylglyoxal, 2,3-butanedione, 1,2-cyclohexanedione, and ninhydrin. Derivatization of arginine residues requires that the reaction be performed in alkaline conditions because of the high pKa of the guanidine functional group. Furthermore, these reagents may react with the groups of lysine as well as the arginine epsilon-amino group.

[00202] The specific modification of tyrosyl residues may be made, with particular interest in introducing spectral labels into tyrosyl residues by reaction with aromatic diazonium compounds or tetranitromethane. Most commonly, N-acetylimidizole and tetranitromethane are used to form O-acetyl tyrosyl species and 3-nitro derivatives, respectively.

[00203] Carboxyl side groups (aspartyl or glutamyl) are selectively modified by reaction with carbodiimides (R-N=C=N-R'), where R and R' are different alkyl groups, such as 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-4-ethyl) carbodiimide or 1-ethyl-3-(4-azonia-4,4-dimethylpentyl) carbodiimide. Furthermore, aspartyl and glutamyl residues are converted to asparaginyl and glutaminyl residues by reaction with ammonium ions.

[00204] Other modifications include hydroxylation of proline and lysine, phosphorylation of hydroxyl groups of seryl or threonyl residues, methylation of the alpha-amino groups of lysine, arginine, and histidine side chains (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp.

79-86 (1983)), deamidation of asparagine or glutamine, acetylation of the N-terminal amine, and/or amidation or esterification of the C-terminal carboxylic acid group.

[00205] Another type of covalent modification involves chemically or enzymatically coupling glycosides to the analog. Sugar(s) may be attached to (a) arginine and histidine, (b) free carboxyl groups, (c) free sulfhydryl groups such as those of cysteine, (d) free hydroxyl groups such as those of serine, threonine, or hydroxyproline, (e) aromatic residues such as those of tyrosine, or tryptophan, or (f) the amide group of glutamine. These methods are described in WO87/05330 published 11 Sep. 1987, and in Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

[00206] In some embodiments, the glucagon analog is conjugated to a heterologous moiety via covalent linkage between a side chain of an amino acid of the glucagon analog and the heterologous moiety. In some embodiments, the glucagon analog is conjugated to a heterologou moiety via the side chain of an amino acid at position 16, 17, 21, 24, or 29, a position within a C-terminal extension, or the C-terminal amino acid, or a combination of these positions. In some aspects, the amino acid covalently linked to a heterologous moiety (e.g., the amino acid comprising a heterologous moiety) is a Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the side chain of the amino acid is covalently bonded to a heterologous moiety.

[00207] In some embodiments, the conjugate comprises a linker that joins the glucagon analog to the heterologous moiety. In some aspects, the linker comprises a chain of atoms from 1 to about 60, or 1 to 30 atoms or longer, 2 to 5 atoms, 2 to 10 atoms, 5 to 10 atoms, or 10 to 20 atoms long. In some embodiments, the chain atoms are all carbon atoms. In some embodiments, the chain atoms in the backbone of the linker are selected from the group consisting of C, O, N, and S. Chain atoms and linkers may be selected according to their expected solubility (hydrophilicity) so as to provide a more soluble conjugate. In some embodiments, the linker provides a functional group that is subject to cleavage by an enzyme or other catalyst or hydrolytic conditions found in the target tissue or organ or cell. In some embodiments, the length of the linker is long enough to reduce the potential for steric hindrance. If the linker is a covalent bond or a peptidyl bond and the conjugate is a polypeptide, the entire conjugate can be a fusion protein. Such peptidyl linkers may be any length. Exemplary linkers are from about 1 to 50 amino acids in length, 5 to 50, 3 to 5, 5 to 10, 5 to 15, or 10 to 30 amino acids in length. Such fusion proteins may alternatively be produced by recombinant genetic engineering methods known to one of ordinary skill in the art.

Conjugates: Fc fusions

[00208] As noted above, in some embodiments, the analogs are conjugated, e.g., fused to an immunoglobulin or portion thereof (e.g.,variable region, CDR, or Fc region). Known types of immunoglobulins (Ig) include IgG, IgA, IgE, IgD or IgM. The Fc region is a C-terminal region of an Ig heavy chain, which is responsible for binding to Fc receptors that carry out activities such as recycling (which results in prolonged half-life), antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and complement dependent cytotoxicity (CDC).

[00209] For example, according to some definitions the human IgG heavy chain Fc region stretches from Cys226 to the C-terminus of the heavy chain. The "hinge region" generally extends from Glu216 to Pro230 of human IgG1 (hinge regions of other IgG isotypes may be aligned with the IgG1 sequence by aligning the cysteines involved in cysteine bonding). The Fc region of an IgG includes two constant domains, CH2 and CH3. The CH2 domain of a human IgG Fc region usually extends from amino acids 231 to amino acid 341. The CH3 domain of a human IgG Fc region usually extends from amino acids 342 to 447. References made to amino acid numbering of immunoglobulins or immunoglobulin fragments, or regions, are all based on Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md. In a related embodiments, the Fc region may comprise one or more native or modified constant regions from an immunoglobulin heavy chain, other than CH1, for example, the CH2 and CH3 regions of IgG and IgA, or the CH3 and CH4 regions of IgE.

[00210] Suitable conjugate moieties include portions of immunoglobulin sequence that include the FcRn binding site. FcRn, a salvage receptor, is responsible for recycling immunoglobulins and returning them to circulation in blood. The region of the Fc portion of IgG that binds to the FcRn receptor has been described based on X-ray crystallography (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). The major contact area of the Fc with the FcRn is near the junction of the CH2 and CH3 domains. Fc-FcRn contacts are all within a single Ig heavy chain. The major contact sites include amino acid residues 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, and 314 of the CH2 domain and amino acid residues 385-387, 428, and 433-436 of the CH3 domain.

[00211] Some conjugate moieties may or may not include FcγR binding site(s). FcγR are responsible for ADCC and CDC. Examples of positions within the Fc region that make a direct contact with FcγR are amino acids 234-239 (lower hinge region), amino acids 265-269 (B/C loop), amino acids 297-299 (C'/E loop), and amino acids 327-332

(F/G) loop (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000). The lower hinge region of IgE has also been implicated in the FcRI binding (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578, 1997). Residues involved in IgA receptor binding are described in Lewis et al., (J Immunol. 175:6694-701, 2005). Amino acid residues involved in IgE receptor binding are described in Sayers et al. (J Biol Chem. 279(34):35320-5, 2004).

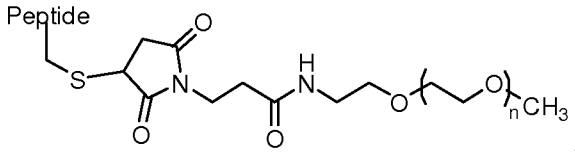
[00212] Amino acid modifications may be made to the Fc region of an immunoglobulin. Such variant Fc regions comprise at least one amino acid modification in the CH3 domain of the Fc region (residues 342-447) and/or at least one amino acid modification in the CH2 domain of the Fc region (residues 231-341). Mutations believed to impart an increased affinity for FcRn include T256A, T307A, E380A, and N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591). Other mutations may reduce binding of the Fc region to FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, and/or FcγRIIIA without significantly reducing affinity for FcRn. For example, substitution of the Asn at position 297 of the Fc region with Ala or another amino acid removes a highly conserved N-glycosylation site and may result in reduced immunogenicity with concomitant prolonged half-life of the Fc region, as well as reduced binding to FcγRs (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Amino acid modifications at positions 233-236 of IgG1 have been made that reduce binding to FcγRs (Ward and Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 and Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). Some exemplary amino acid substitutions are described in US Patents 7,355,008 and 7,381,408, each incorporated by reference herein in its entirety.

Conjugates: Hydrophilic moieties

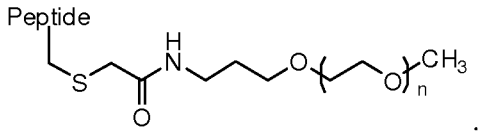
[00213] The glucagon analogs described herein can be further modified to improve its solubility and stability in aqueous solutions at physiological pH, while retaining the high biological activity relative to native glucagon. Hydrophilic moieties such as PEG groups can be attached to the analogs under any suitable conditions used to react a protein with an activated polymer molecule. Any means known in the art can be used, including via acylation, reductive alkylation, Michael addition, thiol alkylation or other chemoselective conjugation/ligation methods through a reactive group on the PEG moiety (e.g., an aldehyde, amino, ester, thiol, α-haloacetyl, maleimido or hydrazino group) to a reactive group on the target compound (e.g., an aldehyde, amino, ester, thiol, α-haloacetyl, maleimido or hydrazino group). Activating groups which can be used to link the water soluble polymer to one or more proteins include without limitation sulfone, maleimide,

sulfhydryl, thiol, triflate, tresylate, azidirine, oxirane, 5-pyridyl, and alpha-halogenated acyl group (e.g., alpha-iodo acetic acid, alpha-bromoacetic acid, alpha-chloroacetic acid). If attached to the analog by reductive alkylation, the polymer selected should have a single reactive aldehyde so that the degree of polymerization is controlled. See, for example, Kinstler et al., *Adv. Drug. Delivery Rev.* 54: 477-485 (2002); Roberts et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 54: 459-476 (2002); and Zalipsky et al., *Adv. Drug Delivery Rev.* 16: 157-182 (1995).

[00214] In specific aspects, an amino acid residue of the analog having a thiol is modified with a hydrophilic moiety such as PEG. In some embodiments, the thiol is modified with maleimide-activated PEG in a Michael addition reaction to result in a PEGylated analog comprising the thioether linkage shown below:



[00215] In some embodiments, the thiol is modified with a haloacetyl-activated PEG in a nucleophilic substitution reaction to result in a PEGylated analog comprising the thioether linkage shown below:



Suitable hydrophilic moieties include polyethylene glycol (PEG), polypropylene glycol, polyoxyethylated polyols (e.g., POG), polyoxyethylated sorbitol, polyoxyethylated glucose, polyoxyethylated glycerol (POG), polyoxyalkylenes, polyethylene glycol propionaldehyde, copolymers of ethylene glycol/propylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, mono-(C1-C10) alkoxy- or aryloxy-polyethylene glycol, carboxymethylcellulose, polyacetals, polyvinyl alcohol (PVA), polyvinyl pyrrolidone, poly-1, 3-dioxolane, poly-1,3,6-trioxane, ethylene/maleic anhydride copolymer, poly (.beta.-amino acids) (either homopolymers or random copolymers), poly(n-vinyl pyrrolidone)polyethylene glycol, propropylene glycol homopolymers (PPG) and other polyakylene oxides, polypropylene oxide/ethylene oxide copolymers, colonic acids or other polysaccharide polymers, Ficoll or dextran and mixtures thereof. Dextrans are polysaccharide polymers of glucose subunits, predominantly linked by α1-6 linkages. Dextran is available in many molecular weight ranges, e.g., about 1 kD to about 100 kD,

or from about 5, 10, 15 or 20 kD to about 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 or 90 kD. Linear or branched polymers are contemplated. Resulting preparations of conjugates may be essentially monodisperse or polydisperse, and may have about 0.5, 0.7, 1, 1.2, 1.5 or 2 polymer moieties per analog.

[00216] In some embodiments, the glucagon analog is conjugated to a hydrophilic moiety via covalent linkage between a side chain of an amino acid of the glucagon analog and the hydrophilic moiety. In some embodiments, the glucagon analog is conjugated to a hydrophilic moiety via the side chain of an amino acid at position 16, 17, 21, 24, or 29, a position within a C-terminal extension, or the C-terminal amino acid, or a combination of these positions. In some aspects, the amino acid covalently linked to a hydrophilic moiety (e.g., the amino acid comprising a hydrophilic moiety) is a Cys, Lys, Orn, homo-Cys, or Ac-Phe, and the side chain of the amino acid is covalently bonded to a hydrophilic moiety (e.g., PEG).

Conjugates: rPEG

[00217] In some embodiments, the conjugate of the present disclosure comprises the analog having glucagon and/or GLP-1 agonist activity fused to an accessory analog which is capable of forming an extended conformation similar to chemical PEG (e.g., a recombinant PEG (rPEG) molecule), such as those described in International Patent Application Publication No. WO2009/023270 and U.S. Patent Application Publication No. US20080286808. The rPEG molecule in some aspects is a polypeptide comprising one or more of glycine, serine, glutamic acid, aspartic acid, alanine, or proline. In some aspects, the rPEG is a homopolymer, e.g., poly-glycine, poly-serine, poly-glutamic acid, poly-aspartic acid, poly-alanine, or poly-proline. In other embodiments, the rPEG comprises two types of amino acids repeated, e.g., poly(Gly-Ser), poly(Gly-Glu), poly(Gly-Ala), poly(Gly-Asp), poly(Gly-Pro), poly(Ser-Glu), etc. In some aspects, the rPEG comprises three different types of amino acids, e.g., poly(Gly-Ser-Glu). In specific aspects, the rPEG increases the half-life of the Glucagon and/or GLP-1 agonist analog. In some aspects, the rPEG comprises a net positive or net negative charge. The rPEG in some aspects lacks secondary structure. In some embodiments, the rPEG is greater than or equal to 10 amino acids in length and in some embodiments is about 40 to about 50 amino acids in length. The accessory peptide in some aspects is fused to the N- or C-terminus of the analog of the present disclosure through a peptide bond or a proteinase cleavage site, or is inserted into the loops of the analog of the present disclosure. The rPEG in some aspects comprises an affinity tag or is linked to a PEG that is greater than 5

kDa. In some embodiments, the rPEG confers the analog of the present disclosure with an increased hydrodynamic radius, serum half-life, protease resistance, or solubility and in some aspects confers the analog with decreased immunogenicity.

Conjugates: Multimers

[00218] The invention further provides multimers or dimers of the analogs disclosed herein, including homo- or hetero- multimers or homo- or hetero- dimers. Two or more of the analogs can be linked together using standard linking agents and procedures known to those skilled in the art. For example, dimers can be formed between two peptides through the use of bifunctional thiol crosslinkers and bi-functional amine crosslinkers, particularly for the analogs that have been substituted with cysteine, lysine ornithine, homocysteine or acetyl phenylalanine residues. The dimer can be a homodimer or alternatively can be a heterodimer. In certain embodiments, the linker connecting the two (or more) analogs is PEG, e.g., a 5 kDa PEG, 20 kDa PEG. In some embodiments, the linker is a disulfide bond. For example, each monomer of the dimer may comprise a Cys residue (e.g., a terminal or internally positioned Cys) and the sulfur atom of each Cys residue participates in the formation of the disulfide bond. In some aspects, the monomers are connected via terminal amino acids (e.g., N-terminal or C-terminal), via internal amino acids, or via a terminal amino acid of at least one monomer and an internal amino acid of at least one other monomer. In specific aspects, the monomers are not connected via an N-terminal amino acid. In some aspects, the monomers of the multimer are attached together in a "tail-to-tail" orientation in which the C-terminal amino acids of each monomer are attached together.

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS, USES AND KITS

Salts

[00219] In some embodiments, the glucagon analog is in the form of a salt, e.g., a pharmaceutically acceptable salt. As used herein the term "pharmaceutically acceptable salt" refers to salts of compounds that retain the biological activity of the parent compound, and which are not biologically or otherwise undesirable. Such salts can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the analog, or separately prepared by reacting a free base function with a suitable acid. Many of the compounds disclosed herein are capable of forming acid and/or base salts by virtue of the presence of amino and/or carboxyl groups or groups similar thereto.

[00220] Pharmaceutically acceptable acid addition salts may be prepared from inorganic and organic acids. Representative acid addition salts include, but are not

limited to acetate, adipate, alginate, citrate, aspartate, benzoate, benzenesulfonate, bisulfate, sodium bisulfate, butyrate, camphorate, camphor sulfonate, digluconate, glycerophosphate, hemisulfate, heptanoate, hexanoate, fumarate, hydrochloride, hydrobromide, hydroiodide, 2-hydroxyethansulfonate (isothionate), lactate, maleate, methane sulfonate, nicotinate, 2-naphthalene sulfonate, oxalate, palmitoate, pectinate, persulfate, 3-phenylpropionate, picrate, pivalate, propionate, succinate, sulfate, tartrate, thiocyanate, phosphate, glutamate, bicarbonate, p-toluenesulfonate, and undecanoate. Salts derived from inorganic acids include hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulfuric acid, nitric acid, phosphoric acid, and the like. Salts derived from organic acids include acetic acid, trifluoroacetic acid, propionic acid, glycolic acid, pyruvic acid, oxalic acid, malic acid, malonic acid, succinic acid, maleic acid, fumaric acid, tartaric acid, citric acid, benzoic acid, cinnamic acid, mandelic acid, methanesulfonic acid, ethanesulfonic acid, p-toluene-sulfonic acid, salicylic acid, and the like. Examples of acids which can be employed to form pharmaceutically acceptable acid addition salts include, for example, an inorganic acid, e.g., hydrochloric acid, hydrobromic acid, sulphuric acid, and phosphoric acid, and an organic acid, e.g., oxalic acid, maleic acid, succinic acid, and citric acid.

[00221] Basic addition salts also can be prepared *in situ* during the final isolation and purification of the source of salicylic acid, or by reacting a carboxylic acid-containing moiety with a suitable base such as the hydroxide, carbonate, or bicarbonate of a pharmaceutically acceptable metal cation or with ammonia or an organic primary, secondary, or tertiary amine. Pharmaceutically acceptable salts include, but are not limited to, cations based on alkali metals or alkaline earth metals such as lithium, sodium, potassium, calcium, magnesium, and aluminum salts, and the like, and nontoxic quaternary ammonia and amine cations including ammonium, tetramethylammonium, tetraethylammonium, methylammonium, dimethylammonium, trimethylammonium, triethylammonium, diethylammonium, and ethylammonium, amongst others. Other representative organic amines useful for the formation of base addition salts include, for example, ethylenediamine, ethanolamine, diethanolamine, piperidine, piperazine, and the like. Salts derived from organic bases include, but are not limited to, salts of primary, secondary and tertiary amines.

[00222] Further, basic nitrogen-containing groups can be quaternized with the analog of the present disclosure as lower alkyl halides such as methyl, ethyl, propyl, and butyl chlorides, bromides, and iodides; long chain halides such as decyl, lauryl, myristyl, and

stearyl chlorides, bromides, and iodides; arylalkyl halides like benzyl and phenethyl bromides and others. Water or oil-soluble or dispersible products are thereby obtained.

Formulations

[00223] In accordance with some embodiments, a pharmaceutical composition is provided wherein the composition comprises a glucagon analog of the present disclosure, or pharmaceutically acceptable salt thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier. The pharmaceutical composition can comprise any pharmaceutically acceptable ingredient, including, for example, acidifying agents, additives, adsorbents, aerosol propellants, air displacement agents, alkalizing agents, anticaking agents, anticoagulants, antimicrobial preservatives, antioxidants, antiseptics, bases, binders, buffering agents, chelating agents, coating agents, coloring agents, desiccants, detergents, diluents, disinfectants, disintegrants, dispersing agents, dissolution enhancing agents, dyes, emollients, emulsifying agents, emulsion stabilizers, fillers, film forming agents, flavor enhancers, flavoring agents, flow enhancers, gelling agents, granulating agents, humectants, lubricants, mucoadhesives, ointment bases, ointments, oleaginous vehicles, organic bases, pastille bases, pigments, plasticizers, polishing agents, preservatives, sequestering agents, skin penetrants, solubilizing agents, solvents, stabilizing agents, suppository bases, surface active agents, surfactants, suspending agents, sweetening agents, therapeutic agents, thickening agents, tonicity agents, toxicity agents, viscosity-increasing agents, water-absorbing agents, water-miscible cosolvents, water softeners, or wetting agents.

[00224] In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises any one or a combination of the following components: acacia, acesulfame potassium, acetyltributyl citrate, acetyltriethyl citrate, agar, albumin, alcohol, dehydrated alcohol, denatured alcohol, dilute alcohol, aleuritic acid, alginic acid, aliphatic polyesters, alumina, aluminum hydroxide, aluminum stearate, amylopectin, α-amylose, ascorbic acid, ascorbyl palmitate, aspartame, bacteriostatic water for injection, bentonite, bentonite magma, benzalkonium chloride, benzethonium chloride, benzoic acid, benzyl alcohol, benzyl benzoate, bronopol, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, butylparaben, butylparaben sodium, calcium alginate, calcium ascorbate, calcium carbonate, calcium cyclamate, dibasic anhydrous calcium phosphate, dibasic dehydrate calcium phosphate, tribasic calcium phosphate, calcium propionate, calcium silicate, calcium sorbate, calcium stearate, calcium sulfate, calcium sulfate hemihydrate, canola oil, carbomer, carbon dioxide, carboxymethyl cellulose calcium, carboxymethyl cellulose sodium, β-carotene,

carrageenan, castor oil, hydrogenated castor oil, cationic emulsifying wax, cellulose acetate, cellulose acetate phthalate, ethyl cellulose, microcrystalline cellulose, powdered cellulose, silicified microcrystalline cellulose, sodium carboxymethyl cellulose, cetostearyl alcohol, cetrimide, cetyl alcohol, chlorhexidine, chlorobutanol, chlorocresol, cholesterol, chlorhexidine acetate, chlorhexidine gluconate, chlorhexidine hydrochloride, chlorodifluoroethane (HCFC), chlorodifluoromethane, chlorofluorocarbons (CFC)chlorophenoxyethanol, chloroxylenol, corn syrup solids, anhydrous citric acid, citric acid monohydrate, cocoa butter, coloring agents, corn oil, cottonseed oil, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmellose sodium, crospovidone, cyclamic acid, cyclodextrins, dextrates, dextrin, dextrose, dextrose anhydrous, diazolidinyl urea, dibutyl phthalate, dibutyl sebacate, diethanolamine, diethyl phthalate, difluoroethane (HFC), dimethyl-β-cyclodextrin, cyclodextrin-type compounds such as Captisol®, dimethyl ether, dimethyl phthalate, dipotassium edentate, disodium edentate, disodium hydrogen phosphate, docusate calcium, docusate potassium, docusate sodium, dodecyl gallate, dodecyltrimethylammonium bromide, edentate calcium disodium, edtic acid, eglumine, ethyl alcohol, ethylcellulose, ethyl gallate, ethyl laurate, ethyl maltol, ethyl oleate, ethylparaben, ethylparaben potassium, ethylparaben sodium, ethyl vanillin, fructose, fructose liquid, fructose milled, fructose pyrogen-free, powdered fructose, fumaric acid, gelatin, glucose, liquid glucose, glyceride mixtures of saturated vegetable fatty acids, glycerin, glyceryl behenate, glyceryl monooleate, glyceryl monostearate, self-emulsifying glyceryl monostearate, glyceryl palmitostearate, glycine, glycols, glycofurol, guar gum, heptafluoropropane (HFC), hexadecyltrimethylammonium bromide, high fructose syrup, human serum albumin, hydrocarbons (HC), dilute hydrochloric acid, hydrogenated vegetable oil, type II, hydroxyethyl cellulose, 2-hydroxyethyl-β-cyclodextrin, hydroxypropyl cellulose, low-substituted hydroxypropyl cellulose, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin, hydroxypropyl methylcellulose, hydroxypropyl methylcellulose phthalate, imidurea, indigo carmine, ion exchangers, iron oxides, isopropyl alcohol, isopropyl myristate, isopropyl palmitate, isotonic saline, kaolin, lactic acid, lactitol, lactose, lanolin, lanolin alcohols, anhydrous lanolin, lecithin, magnesium aluminum silicate, magnesium carbonate, normal magnesium carbonate, magnesium carbonate anhydrous, magnesium carbonate hydroxide, magnesium hydroxide, magnesium lauryl sulfate, magnesium oxide, magnesium silicate, magnesium stearate, magnesium trisilicate, magnesium trisilicate anhydrous, malic acid, malt, maltitol, maltitol solution, maltodextrin, maltol, maltose, mannitol, medium chain triglycerides, meglumine, menthol, methylcellulose, methyl

methacrylate, methyl oleate, methylparaben, methylparaben potassium, methylparaben sodium, microcrystalline cellulose and carboxymethylcellulose sodium, mineral oil, light mineral oil, mineral oil and lanolin alcohols, oil, olive oil, monoethanolamine, montmorillonite, octyl gallate, oleic acid, palmitic acid, paraffin, peanut oil, petrolatum, petrolatum and lanolin alcohols, pharmaceutical glaze, phenol, liquified phenol, phenoxyethanol, phenoxypropanol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric acetate, phenylmercuric borate, phenylmercuric nitrate, polacrilin, polacrilin potassium, poloxamer, polydextrose, polyethylene glycol, polyethylene oxide, polyacrylates, polyethylene-polyoxypropylene-block polymers, polymethacrylates, polyoxyethylene alkyl ethers, polyoxyethylene castor oil derivatives, polyoxyethylene sorbitol fatty acid esters, polyoxyethylene stearates, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, potassium alginate, potassium benzoate, potassium bicarbonate, potassium bisulfite, potassium chloride, postassium citrate, potassium citrate anhydrous, potassium hydrogen phosphate, potassium metabisulfite, monobasic potassium phosphate, potassium propionate, potassium sorbate, povidone, propanol, propionic acid, propylene carbonate, propylene glycol, propylene glycol alginate, propyl gallate, propylparaben, propylparaben potassium, propylparaben sodium, protamine sulfate, rapeseed oil, Ringer's solution, saccharin, saccharin ammonium, saccharin calcium, saccharin sodium, safflower oil, saponite, serum proteins, sesame oil, colloidal silica, colloidal silicon dioxide, sodium alginate, sodium ascorbate, sodium benzoate, sodium bicarbonate, sodium bisulfite, sodium chloride, anhydrous sodium citrate, sodium citrate dehydrate, sodium chloride, sodium cyclamate, sodium edentate, sodium dodecyl sulfate, sodium lauryl sulfate, sodium metabisulfite, sodium phosphate, dibasic, sodium phosphate, monobasic, sodium phosphate, tribasic, anhydrous sodium propionate, sodium propionate, sodium sorbate, sodium starch glycolate, sodium stearyl fumarate, sodium sulfite, sorbic acid, sorbitan esters (sorbitan fatty esters), sorbitol, sorbitol solution 70%, soybean oil, spermaceti wax, starch, corn starch, potato starch, pregelatinized starch, sterilizable maize starch, stearic acid, purified stearic acid, stearyl alcohol, sucrose, sugars, compressible sugar, confectioner's sugar, sugar spheres, invert sugar, *Sugartab*, Sunset Yellow FCF, synthetic paraffin, talc, tartaric acid, tartrazine, tetrafluoroethane (HFC), theobroma oil, thimerosal, titanium dioxide, alpha tocopherol, tocopheryl acetate, alpha tocopheryl acid succinate, beta-tocopherol, delta-tocopherol, gamma-tocopherol, tragacanth, triacetin, tributyl citrate, triethanolamine, triethyl citrate, trimethyl-β-cyclodextrin, trimethyltetradecylammonium bromide, tris buffer, trisodium edentate, vanillin, type I

hydrogenated vegetable oil, water, soft water, hard water, carbon dioxide-free water, pyrogen-free water, water for injection, sterile water for inhalation, sterile water for injection, sterile water for irrigation, waxes, anionic emulsifying wax, carnauba wax, cationic emulsifying wax, cetyl ester wax, microcrystalline wax, nonionic emulsifying wax, suppository wax, white wax, yellow wax, white petrolatum, wool fat, xanthan gum, xylitol, zein, zinc propionate, zinc salts, zinc stearate, or any excipient in the *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, Third Edition, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, London, UK, 2000), which is incorporated by reference in its entirety. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, Sixteenth Edition, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), which is incorporated by reference in its entirety, discloses various components used in formulating pharmaceutically acceptable compositions and known techniques for the preparation thereof. Except insofar as any conventional agent is incompatible with the pharmaceutical compositions, its use in pharmaceutical compositions is contemplated. Supplementary active ingredients also can be incorporated into the compositions.

[00225] In some embodiments, the foregoing component(s) may be present in the pharmaceutical composition at any concentration, such as, for example, at least A, wherein A is 0.0001% w/v, 0.001% w/v, 0.01% w/v, 0.1% w/v, 1% w/v, 2% w/v, 5% w/v, 10% w/v, 20% w/v, 30% w/v, 40% w/v, 50% w/v, 60% w/v, 70% w/v, 80% w/v, or 90% w/v. In some embodiments, the foregoing component(s) may be present in the pharmaceutical composition at any concentration, such as, for example, at most B, wherein B is 90% w/v, 80% w/v, 70% w/v, 60% w/v, 50% w/v, 40% w/v, 30% w/v, 20% w/v, 10% w/v, 5% w/v, 2% w/v, 1% w/v, 0.1% w/v, 0.001% w/v, or 0.0001%. In other embodiments, the foregoing component(s) may be present in the pharmaceutical composition at any concentration range, such as, for example from about A to about B. In some embodiments, A is 0.0001% and B is 90%.

[00226] The pharmaceutical compositions may be formulated to achieve a physiologically compatible pH. In some embodiments, the pH of the pharmaceutical composition may be at least 5, at least 5.5, at least 6, at least 6.5, at least 7, at least 7.5, at least 8, at least 8.5, at least 9, at least 9.5, at least 10, or at least 10.5 up to and including pH 11, depending on the formulation and route of administration. In certain embodiments, the pharmaceutical compositions may comprise buffering agents to achieve a physiological compatible pH. The buffering agents may include any compounds capabale of buffering at the desired pH such as, for example, phosphate buffers

(e.g.,PBS), triethanolamine, Tris, bicine, TAPS, tricine, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodylate, MES, and others. In certain embodiments, the strength of the buffer is at least 0.5 mM, at least 1 mM, at least 5 mM, at least 10 mM, at least 20 mM, at least 30 mM, at least 40 mM, at least 50 mM, at least 60 mM, at least 70 mM, at least 80 mM, at least 90 mM, at least 100 mM, at least 120 mM, at least 150 mM, or at least 200 mM. In some embodiments, the strength of the buffer is no more than 300 mM (e.g.,at most 200 mM, at most 100 mM, at most 90 mM, at most 80 mM, at most 70 mM, at most 60 mM, at most 50 mM, at most 40 mM, at most 30 mM, at most 20 mM, at most 10 mM, at most 5 mM, at most 1 mM).

Routes of Administration

[00227] The following discussion on routes of administration is merely provided to illustrate exemplary embodiments and should not be construed as limiting the scope in any way.

[00228] Formulations suitable for oral administration can consist of (a) liquid solutions, such as an effective amount of the analog of the present disclosure dissolved in diluents, such as water, saline, or orange juice; (b) capsules, sachets, tablets, lozenges, and troches, each containing a predetermined amount of the active ingredient, as solids or granules; (c) powders; (d) suspensions in an appropriate liquid; and (e) suitable emulsions. Liquid formulations may include diluents, such as water and alcohols, for example, ethanol, benzyl alcohol, and the polyethylene alcohols, either with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant. Capsule forms can be of the ordinary hard- or soft-shelled gelatin type containing, for example, surfactants, lubricants, and inert fillers, such as lactose, sucrose, calcium phosphate, and corn starch. Tablet forms can include one or more of lactose, sucrose, mannitol, corn starch, potato starch, alginic acid, microcrystalline cellulose, acacia, gelatin, guar gum, colloidal silicon dioxide, croscarmellose sodium, talc, magnesium stearate, calcium stearate, zinc stearate, stearic acid, and other excipients, colorants, diluents, buffering agents, disintegrating agents, moistening agents, preservatives, flavoring agents, and other pharmacologically compatible excipients. Lozenge forms can comprise the analog of the present disclosure in a flavor, usually sucrose and acacia or tragacanth, as well as pastilles comprising the analog of the present disclosure in an inert base, such as gelatin and glycerin, or sucrose and acacia, emulsions, gels, and the like containing, in addition to, such excipients as are known in the art.

[00229] The analogs of the disclosure, alone or in combination with other suitable components, can be delivered via pulmonary administration and can be made into aerosol formulations to be administered via inhalation. These aerosol formulations can be placed into pressurized acceptable propellants, such as dichlorodifluoromethane, propane, nitrogen, and the like. They also may be formulated as pharmaceuticals for non-pressured preparations, such as in a nebulizer or an atomizer. Such spray formulations also may be used to spray mucosa. In some embodiments, the analog is formulated into a powder blend or into microparticles or nanoparticles. Suitable pulmonary formulations are known in the art. See, e.g., Qian et al., Int J Pharm 366: 218-220 (2009); Adjei and Garren, Pharmaceutical Research, 7(6): 565-569 (1990); Kawashima et al., J Controlled Release 62(1-2): 279-287 (1999); Liu et al., Pharm Res 10(2): 228-232 (1993); International Patent Application Publication Nos. WO 2007/133747 and WO 2007/141411.

[00230] Formulations suitable for parenteral administration include aqueous and non-aqueous, isotonic sterile injection solutions, which can contain anti-oxidants, buffers, bacteriostats, and solutes that render the formulation isotonic with the blood of the intended recipient, and aqueous and non-aqueous sterile suspensions that can include suspending agents, solubilizers, thickening agents, stabilizers, and preservatives. The term, "parenteral" means not through the alimentary canal but by some other route such as subcutaneous, intramuscular, intraspinal, or intravenous. The analog of the present disclosure can be administered with a physiologically acceptable diluent in a pharmaceutical carrier, such as a sterile liquid or mixture of liquids, including water, saline, aqueous dextrose and related sugar solutions, an alcohol, such as ethanol or hexadecyl alcohol, a glycol, such as propylene glycol or polyethylene glycol, dimethylsulfoxide, glycerol, ketals such as 2,2- dimethyl-l53-dioxolane-4-methanol, ethers, poly(ethyleneglycol) 400, oils, fatty acids, fatty acid esters or glycerides, or acetylated fatty acid glycerides with or without the addition of a pharmaceutically acceptable surfactant, such as a soap or a detergent, suspending agent, such as pectin, carbomers, methylcellulose, hydroxypropylmethylcellulose, or carboxymethylcellulose, or emulsifying agents and other pharmaceutical adjuvants.

[00231] Oils, which can be used in parenteral formulations include petroleum, animal, vegetable, or synthetic oils. Specific examples of oils include peanut, soybean, sesame, cottonseed, corn, olive, petrolatum, and mineral. Suitable fatty acids for use in parenteral

formulations include oleic acid, stearic acid, and isostearic acid. Ethyl oleate and isopropyl myristate are examples of suitable fatty acid esters.

[00232] Suitable soaps for use in parenteral formulations include fatty alkali metal, ammonium, and triethanolamine salts, and suitable detergents include (a) cationic detergents such as, for example, dimethyl dialkyl ammonium halides, and alkyl pyridinium halides, (b) anionic detergents such as, for example, alkyl, aryl, and olefin sulfonates, alkyl, olefin, ether, and monoglyceride sulfates, and sulfosuccinates, (c) nonionic detergents such as, for example, fatty amine oxides, fatty acid alkanolamides, and polyoxyethylenepolypropylene copolymers, (d) amphoteric detergents such as, for example, alkyl-β-aminopropionates, and 2-alkyl -imidazoline quaternary ammonium salts, and (e) mixtures thereof.

[00233] The parenteral formulations can be presented in unit-dose or multi-dose sealed containers, such as ampoules and vials, and can be stored in a freeze-dried (lyophilized) condition requiring only the addition of the sterile liquid excipient, for example, water, for injections, immediately prior to use. Extemporaneous injection solutions and suspensions can be prepared from sterile powders, granules, and tablets of the kind known in the art.

[00234] Injectable formulations are in accordance with the invention. The requirements for effective pharmaceutical carriers for injectable compositions are well-known to those of ordinary skill in the art (see, e.g., *Pharmaceutics and Pharmacy Practice*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., pages 238-250 (1982), and *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4th ed., pages 622-630 (1986)).

[00235] Additionally, the analog of the present disclosures can be made into suppositories for rectal administration by mixing with a variety of bases, such as emulsifying bases or water-soluble bases. Formulations suitable for vaginal administration can be presented as pessaries, tampons, creams, gels, pastes, foams, or spray formulas containing, in addition to the active ingredient, such carriers as are known in the art to be appropriate.

[00236] It will be appreciated by one of skill in the art that, in addition to the above-described pharmaceutical compositions, the analog of the disclosure can be formulated as inclusion complexes, such as cyclodextrin inclusion complexes, or liposomes.

Dose

[00237] The analogs of the disclosure are believed to be useful in methods of treating a disease or medical condition in which glucagon receptor agonism, GLP-1 receptor agonism, or Glucagon receptor/GLP-1 receptor co-agonism plays a role. For purposes of the disclosure, the amount or dose of the analog of the present disclosure administered should be sufficient to effect, e.g., a therapeutic or prophylactic response, in the subject or animal over a reasonable time frame. For example, the dose of the analog of the present disclosure should be sufficient to stimulate cAMP secretion from cells as described herein or sufficient to decrease blood glucose levels, fat levels, food intake levels, or body weight of a mammal, in a period of from about 1 to 4 minutes, 1 to 4 hours or 1 to 4 weeks or longer, e.g., 5 to 20 or more weeks, from the time of administration. In certain embodiments, the time period could be even longer. The dose will be determined by the efficacy of the particular analog of the present disclosure and the condition of the animal (e.g., human), as well as the body weight of the animal (e.g., human) to be treated.

[00238] Many assays for determining an administered dose are known in the art. For purposes herein, an assay, which comprises comparing the extent to which blood glucose levels are lowered upon administration of a given dose of the analog of the present disclosure to a mammal among a set of mammals of which is each given a different dose of the analog, could be used to determine a starting dose to be administered to a mammal. The extent to which blood glucose levels are lowered upon administration of a certain dose can be assayed by methods known in the art, including, for instance, the methods described herein as Example 4.

[00239] The dose of the analog of the present disclosure also will be determined by the existence, nature and extent of any adverse side effects that might accompany the administration of a particular analog of the present disclosure. Typically, the attending physician will decide the dosage of the analog of the present disclosure with which to treat each individual patient, taking into consideration a variety of factors, such as age, body weight, general health, diet, sex, analog of the present disclosure to be administered, route of administration, and the severity of the condition being treated. By way of example and not intending to limit the invention, the dose of the analog of the present disclosure can be about 0.0001 to about 1 g/kg body weight of the subject being treated/day, from about 0.0001 to about 0.001 g/kg body weight/day, or about 0.01 mg to about 1 g/kg body weight/day.

[00240] In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises any of the analogs disclosed herein at a purity level suitable for administration to a patient. In some

embodiments, the analog has a purity level of at least about 90%, about 91%, about 92%, about 93%, about 94%, about 95%, about 96%, about 97%, about 98% or about 99%, and a pharmaceutically acceptable diluent, carrier or excipient. The pharmaceutical composition in some aspects comprise the analog of the present disclosure at a concentration of at least A, wherein A is about about 0.001 mg/ml, about 0.01 mg/ml, 0 about 1 mg/ml, about 0.5 mg/ml, about 1 mg/ml, about 2 mg/ml, about 3 mg/ml, about 4 mg/ml, about 5 mg/ml, about 6 mg/ml, about 7 mg/ml, about 8 mg/ml, about 9 mg/ml, about 10 mg/ml, about 11 mg/ml, about 12 mg/ml, about 13 mg/ml, about 14 mg/ml, about 15 mg/ml, about 16 mg/ml, about 17 mg/ml, about 18 mg/ml, about 19 mg/ml, about 20 mg/ml, about 21 mg/ml, about 22 mg/ml, about 23 mg/ml, about 24 mg/ml, about 25 mg/ml or higher. In some embodiments, the pharmaceutical composition comprises the analog at a concentration of at most B, wherein B is about 30 mg/ml, about 25 mg/ml, about 24 mg/ml, about 23, mg/ml, about 22 mg/ml, about 21 mg/ml, about 20 mg/ml, about 19 mg/ml, about 18 mg/ml, about 17 mg/ml, about 16 mg/ml, about 15 mg/ml, about 14 mg/ml, about 13 mg/ml, about 12 mg/ml, about 11 mg/ml, about 10 mg/ml, about 9 mg/ml, about 8 mg/ml, about 7 mg/ml, about 6 mg/ml, about 5 mg/ml, about 4 mg/ml, about 3 mg/ml, about 2 mg/ml, about 1 mg/ml, or about 0.1 mg/ml. In some embodiments, the compositions may contain an analog at a concentration range of A to B mg/ml, for example, about 0.001 to about 30.0 mg/ml.

Targeted Forms

[00241] One of ordinary skill in the art will readily appreciate that the analogs of the disclosure can be modified in any number of ways, such that the therapeutic or prophylactic efficacy of the analog of the present disclosures is increased through the modification. For instance, the analog of the present disclosure can be conjugated either directly or indirectly through a linker to a targeting moiety. The practice of conjugating compounds, e.g., glucagon analogs described herein, to targeting moieties is known in the art. See, for instance, Wadhwa et al., *J Drug Targeting*, 3, 111-127 (1995) and U.S. Patent No. 5,087,616. The term "targeting moiety" as used herein, refers to any molecule or agent that specifically recognizes and binds to a cell-surface receptor, such that the targeting moiety directs the delivery of the analog of the present disclosures to a population of cells on which surface the receptor (the glucagon receptor, the GLP-1 receptor) is expressed. Targeting moieties include, but are not limited to, antibodies, or fragments thereof, peptides, hormones, growth factors, cytokines, and any other natural or non-natural ligands, which bind to cell surface receptors (e.g., Epithelial Growth Factor

Receptor (EGFR), T-cell receptor (TCR), B-cell receptor (BCR), CD28, Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGF), nicotinic acetylcholine receptor (nAChR), etc.). As used herein a "linker" is a bond, molecule or group of molecules that binds two separate entities to one another. Linkers may provide for optimal spacing of the two entities or may further supply a labile linkage that allows the two entities to be separated from each other. Labile linkages include photocleavable groups, acid-labile moieties, base-labile moieties and enzyme-cleavable groups. The term "linker" in some embodiments refers to any agent or molecule that bridges the analog of the present disclosures to the targeting moiety. One of ordinary skill in the art recognizes that sites on the analog of the present disclosures, which are not necessary for the function of the analog of the present disclosures, are ideal sites for attaching a linker and/or a targeting moiety, provided that the linker and/or targeting moiety, once attached to the analog of the present disclosures, do(es) not interfere with the function of the analog of the present disclosures, i.e., the ability to stimulate cAMP secretion from cells, to treat diabetes or obesity.

Controlled Release Formulations

[00242] Alternatively, the glucagon analogs described herein can be modified into a depot form, such that the manner in which the analog of the present disclosures is released into the body to which it is administered is controlled with respect to time and location within the body (see, for example, U.S. Patent No. 4,450,150). Depot forms of analog of the present disclosures can be, for example, an implantable composition comprising the analog of the present disclosures and a porous or non-porous material, such as a polymer, wherein the analog of the present disclosures is encapsulated by or diffused throughout the material and/or degradation of the non-porous material. The depot is then implanted into the desired location within the body and the analog of the present disclosures are released from the implant at a predetermined rate.

[00243] The pharmaceutical composition in certain aspects is modified to have any type of *in vivo* release profile. In some aspects, the pharmaceutical composition is an immediate release, controlled release, sustained release, extended release, delayed release, or bi-phasic release formulation. Methods of formulating peptides for controlled release are known in the art. See, for example, Qian et al., *J Pharm* 374: 46-52 (2009) and International Patent Application Publication Nos. WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; and WO 1999/040942.

[00244] The instant compositions may further comprise, for example, micelles or liposomes, or some other encapsulated form, or may be administered in an extended

release form to provide a prolonged storage and/or delivery effect. The disclosed pharmaceutical formulations may be administered according to any regime including, for example, daily (1 time per day, 2 times per day, 3 times per day, 4 times per day, 5 times per day, 6 times per day), every two days, every three days, every four days, every five days, every six days, weekly, bi-weekly, every three weeks, monthly, or bi-monthly.

Combinations

[00245] The glucagon analogs described herein may be administered alone or in combination with other therapeutic agents which aim to treat or prevent any of the diseases or medical conditions described herein. For example, the glucagon analogs described herein may be co-administered with (simultaneously or sequentially) an anti-diabetic or anti-obesity agent. Anti-diabetic agents known in the art or under investigation include insulin, leptin, Peptide YY (PYY), Pancreatic Peptide (PP), fibroblast growth factor 21 (FGF21), Y2Y4 receptor agonists, sulfonylureas, such as tolbutamide (Orinase), acetohexamide (Dymelor), tolazamide (Tolinase), chlorpropamide (Diabinese), glipizide (Glucotrol), glyburide (Diabeta, Micronase, Glynase), glimepiride (Amaryl), or gliclazide (Diamicron); meglitinides, such as repaglinide (Prandin) or nateglinide (Starlix); biguanides such as metformin (Glucophage) or phenformin; thiazolidinediones such as rosiglitazone (Avandia), pioglitazone (Actos), or troglitazone (Rezulin), or other PPARγ inhibitors; alpha glucosidase inhibitors that inhibit carbohydrate digestion, such as miglitol (Glyset), acarbose (Precose/Glucobay); exenatide (Byetta) or pramlintide; Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors such as vildagliptin or sitagliptin; SGLT (sodium-dependent glucose transporter 1) inhibitors; glucokinase activators (GKA); glucagon receptor antagonists (GRA); or FBPase (fructose 1,6-bisphosphatase) inhibitors.

[00246] Anti-obesity agents known in the art or under investigation include appetite suppressants, including phenethylamine type stimulants, phentermine (optionally with fenfluramine or dexfenfluramine), diethylpropion (Tenuate®), phendimetrazine (Prelu-2®, Bontril®), benzphetamine (Didrex®), sibutramine (Meridia®, Reductil®); rimonabant (Acomplia®), other cannabinoid receptor antagonists; oxyntomodulin; fluoxetine hydrochloride (Prozac); Qnexa (topiramate and phentermine), Excalia (bupropion and zonisamide) or Contrave (bupropion and naltrexone); or lipase inhibitors, similar to XENICAL (Orlistat) or Cetilistat (also known as ATL-962), or GT 389-255.

[00247] The peptides described herein in some embodiments are co-administered with an agent for treatment of non-alcoholic fatty liver disease or NASH. Agents used to treat

non-alcoholic fatty liver disease include ursodeoxycholic acid (a.k.a., Actigall, URSO, and Ursodiol), Metformin (Glucophage), rosiglitazone (Avandia), Clofibrate, Gemfibrozil, Polymixin B, and Betaine.

[00248] The peptides described herein in some embodiments are co-administered with an agent for treatment of a neurodegenerative disease, e.g., Parkinson's Disease. Anti-Parkinson's Disease agents are furthermore known in the art and include, but not limited to, levodopa, carbidopa, anticholinergics, bromocriptine, pramipexole, and ropinirole, amantadine, and rasagiline.

[00249] In view of the foregoing, the invention further provides pharmaceutical compositions and kits additionally comprising one of these other therapeutic agents. The additional therapeutic agent may be administered simultaneously or sequentially with the analog of the present disclosure. In some aspects, the analog is administered before the additional therapeutic agent, while in other aspects, the analog is administered after the additional therapeutic agent.

Uses

[00250] It is contemplated that the glucagon analogs described herein and related pharmaceutical compositions are useful for treatment of a disease or medical condition, in which e.g., the lack of activity at the glucagon receptor, the GLP-1 receptor, or at both receptors, is a factor in the onset and/or progression of the disease or medical condition. Accordingly, the invention provides a method of treating or preventing a disease or medical condition in a patient, wherein the disease or medical condition is a disease of medical condition in which a lack of GLP-1 receptor activation and/or glucagon receptor activation is associated with the onset and/or progression of the disease of medical condition. The method comprises providing to the patient an analog in accordance with any of those described herein in an amount effective to treat or prevent the disease or medical condition.

[00251] In some embodiments, the disease or medical condition is metabolic syndrome. Metabolic Syndrome, also known as metabolic syndrome X, insulin resistance syndrome or Reaven's syndrome, is a disorder that affects over 50 million Americans. Metabolic Syndrome is typically characterized by a clustering of at least three or more of the following risk factors: (1) abdominal obesity (excessive fat tissue in and around the abdomen), (2) atherogenic dyslipidemia (blood fat disorders including high triglycerides, low HDL cholesterol and high LDL cholesterol that enhance the accumulation of plaque in the artery walls), (3) elevated blood pressure, (4) insulin resistance or glucose

intolerance, (5) prothrombotic state (e.g.,high fibrinogen or plasminogen activator inhibitor-1 in blood), and (6) pro-inflammatory state (e.g.,elevated C-reactive protein in blood). Other risk factors may include aging, hormonal imbalance and genetic predisposition.

[00252] Metabolic Syndrome is associated with an increased the risk of coronary heart disease and other disorders related to the accumulation of vascular plaque, such as stroke and peripheral vascular disease, referred to as atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD). Patients with Metabolic Syndrome may progress from an insulin resistant state in its early stages to full blown type II diabetes with further increasing risk of ASCVD. Without intending to be bound by any particular theory, the relationship between insulin resistance, Metabolic Syndrome and vascular disease may involve one or more concurrent pathogenic mechanisms including impaired insulin-stimulated vasodilation, insulin resistance-associated reduction in NO availability due to enhanced oxidative stress, and abnormalities in adipocyte-derived hormones such as adiponectin (Lteif and Mather, Can. J. Cardiol. 20 (suppl. B):66B-76B (2004)).

[00253] According to the 2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (ATP III), any three of the following traits in the same individual meet the criteria for Metabolic Syndrome: (a) abdominal obesity (a waist circumference over 102 cm in men and over 88 cm in women); (b) serum triglycerides (150 mg/dl or above); (c) HDL cholesterol (40 mg/dl or lower in men and 50 mg/dl or lower in women); (d) blood pressure (130/85 or more); and (e) fasting blood glucose (110 mg/dl or above). According to the World Health Organization (WHO), an individual having high insulin levels (an elevated fasting blood glucose or an elevated post meal glucose alone) with at least two of the following criteria meets the criteria for Metabolic Syndrome: (a) abdominal obesity (waist to hip ratio of greater than 0.9, a body mass index of at least 30 kg/m2, or a waist measurement over 37 inches); (b) cholesterol panel showing a triglyceride level of at least 150 mg/dl or an HDL cholesterol lower than 35 mg/dl; (c) blood pressure of 140/90 or more, or on treatment for high blood pressure). (Mathur, Ruchi, "Metabolic Syndrome," ed. Shiel, Jr., William C., MedicineNet.com, May 11, 2009).

[00254] For purposes herein, if an individual meets the criteria of either or both of the criteria set forth by the 2001 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel or the WHO, that individual is considered as afflicted with Metabolic Syndrome.

[00255] Without being bound to any particular theory, peptides described herein are useful for treating Metabolic Syndrome. Accordingly, the invention provides a method of preventing or treating Metabolic Syndrome, or reducing one, two, three or more risk factors thereof, in a subject, comprising providing to the subject an analog described herein in an amount effective to prevent or treat Metabolic Syndrome, or the risk factor thereof.

[00256] In some embodiments, the method treats a hyperglycemic medical condition. In certain aspects, the hyperglycemic medical condition is diabetes, diabetes mellitus type I, diabetes mellitus type II, or gestational diabetes, either insulin-dependent or non-insulin-dependent. In some aspects, the method treats the hyperglycemic medical condition by reducing one or more complications of diabetes including nephropathy, retinopathy and vascular disease.

[00257] In some aspects, the disease or medical condition is obesity. In some aspects, the obesity is drug-induced obesity. In some aspects, the method treats obesity by preventing or reducing weight gain or increasing weight loss in the patient. In some aspects, the method treats obesity by reducing appetite, decreasing food intake, lowering the levels of fat in the patient, or decreasing the rate of movement of food through the gastrointestinal system.

[00258] Because obesity is associated with the onset or progression of other diseases, the methods of treating obesity are further useful in methods of reducing complications associated with obesity including vascular disease (coronary artery disease, stroke, peripheral vascular disease, ischemia reperfusion, etc.), hypertension, onset of diabetes type II, hyperlipidemia and musculoskeletal diseases. The invention accordingly provides methods of treating or preventing these obesity-associated complications.

[00259] In some embodiments, the disease or medical condition is Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). NAFLD refers to a wide spectrum of liver disease ranging from simple fatty liver (steatosis), to nonalcoholic steatohepatitis (NASH), to cirrhosis (irreversible, advanced scarring of the liver). All of the stages of NAFLD have in common the accumulation of fat (fatty infiltration) in the liver cells (hepatocytes). Simple fatty liver is the abnormal accumulation of a certain type of fat, triglyceride, in the liver cells with no inflammation or scarring. In NASH, the fat accumulation is associated with varying degrees of inflammation (hepatitis) and scarring (fibrosis) of the liver. The inflammatory cells can destroy the liver cells (hepatocellular necrosis). In the terms "steatohepatitis" and "steatonecrosis", steato refers to fatty infiltration, hepatitis refers to

inflammation in the liver, and necrosis refers to destroyed liver cells. NASH can ultimately lead to scarring of the liver (fibrosis) and then irreversible, advanced scarring (cirrhosis). Cirrhosis that is caused by NASH is the last and most severe stage in the NAFLD spectrum. (Mendler, Michel, "Fatty Liver: Nonalcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) and Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH)," ed. Schoenfield, Leslie J., MedicineNet.com, August 29, 2005).

[00260] Alcoholic Liver Disease, or Alcohol-Induced Liver Disease, encompasses three pathologically distinct liver diseases related to or caused by the excessive consumption of alcohol: fatty liver (steatosis), chronic or acute hepatitis, and cirrhosis. Alcoholic hepatitis can range from a mild hepatitis, with abnormal laboratory tests being the only indication of disease, to severe liver dysfunction with complications such as jaundice (yellow skin caused by bilirubin retention), hepatic encephalopathy (neurological dysfunction caused by liver failure), ascites (fluid accumulation in the abdomen), bleeding esophageal varices (varicose veins in the esophagus), abnormal blood clotting and coma. Histologically, alcoholic hepatitis has a characteristic appearance with ballooning degeneration of hepatocytes, inflammation with neutrophils and sometimes Mallory bodies (abnormal aggregations of cellular intermediate filament proteins). Cirrhosis is characterized anatomically by widespread nodules in the liver combined with fibrosis. (Worman, Howard J., "Alcoholic Liver Disease", Columbia University Medical Center website).

[00261] Without being bound to any particular theory, the analogs described herein are useful for the treatment of Alcoholic Liver Disease, NAFLD, or any stage thereof, including, for example, steatosis, steatohepatitis, hepatitis, hepatic inflammation, NASH, cirrhosis, or complications thereof. Accordingly, the invention provides a method of preventing or treating Alcoholic Liver Disease, NAFLD, or any stage thereof, in a subject comprising providing to a subject an analog described herein in an amount effective to prevent or treat Alcoholic Liver Disease, NAFLD, or the stage thereof. Such treatment methods include reduction in one, two, three or more of the following: liver fat content, incidence or progression of cirrhosis, incidence of hepatocellular carcinoma, signs of inflammation, e.g.,abnormal hepatic enzyme levels (e.g., aspartate aminotransferase AST and/or alanine aminotransferase ALT, or LDH), elevated serum ferritin, elevated serum bilirubin, and/or signs of fibrosis, e.g.,elevated TGF-beta levels. In preferred embodiments, the peptides are used treat patients who have progressed beyond simple

fatty liver (steatosis) and exhibit signs of inflammation or hepatitis. Such methods may result, for example, in reduction of AST and/or ALT levels.

[00262] GLP-1 and exendin-4 have been shown to have some neuroprotective effect. The invention also provides uses of the glucagon analogs described herein in treating neurodegenerative diseases, including but not limited to Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Multiple Sclerosis, Amylotrophic Lateral Sclerosis, other demyelination related disorders, senile dementia, subcortical dementia, arteriosclerotic dementia, AIDS-associated dementia, or other dementias, a central nervous system cancer, traumatic brain injury, spinal cord injury, stroke or cerebral ischemia, cerebral vasculitis, epilepsy, Huntington's disease, Tourette's syndrome, Guillain Barre syndrome, Wilson disease, Pick's disease, neuroinflammatory disorders, encephalitis, encephalomyelitis or meningitis of viral, fungal or bacterial origin, or other central nervous system infections, prion diseases, cerebellar ataxias, cerebellar degeneration, spinocerebellar degeneration syndromes, Friedreichs ataxia, ataxia telangiectasia, spinal dysmyotrophy, progressive supranuclear palsy, dystonia, muscle spasticity, tremor, retinitis pigmentosa, striatonigral degeneration, mitochondrial encephalo-myopathies, neuronal ceroid lipofuscinosis, hepatic encephalopathies, renal encephalopathies, metabolic encephalopathies, toxin-induced encephalopathies, and radiation-induced brain damage.

[00263] In some embodiments, the disease or medical condition is hypoglycemia. In some embodiments, the patient is a diabetic patient and the hypoglycemia is induced by the administration of insulin. In specific aspects, the method comprises providing the analog of the present disclosure in combination with insulin so that the analog buffers the hypoglycemic effects of the bolus administration of insulin.

[00264] In some embodiments, the glucagon analogs are used in conjunction with parenteral administration of nutrients to non-diabetic patients in a hospital setting, e.g., to patients receiving parenteral nutrition or total parenteral nutrition. Nonlimiting examples include surgery patients, patients in comas, patients with digestive tract illness, or a nonfunctional gastrointestinal tract (e.g. due to surgical removal, blockage or impaired absorptive capacity, Crohn's disease, ulcerative colitis, gastrointestinal tract obstruction, gastrointestinal tract fistula, acute pancreatitis, ischemic bowel, major gastrointestinal surgery, certain congenital gastrointestinal tract anomalies, prolonged diarrhea, or short bowel syndrome due to surgery, patients in shock, and patients undergoing healing processes often receive parenteral administration of carbohydrates along with various combinations of lipids, electrolytes, minerals, vitamins and amino acids. The

glucagon analogs and the parenteral nutrition composition can be administered at the same time, at different times, before, or after each other, provided that the glucagon analog is exerting the desired biological effect at the time that the parenteral nutrition composition is being digested. For example, the parenteral nutrition may be administered, 1, 2 or 3 times per day, while the glucagon analog is administered once every other day, three times a week, two times a week, once a week, once every 2 weeks, once every 3 weeks, or once a month.

[00265] As used herein, the terms "treat," and "prevent" as well as words stemming therefrom, do not necessarily imply 100% or complete treatment or prevention. Rather, there are varying degrees of treatment or prevention of which one of ordinary skill hi the art recognizes as having a potential benefit or therapeutic effect. In this respect, the inventive methods can provide any amount of any level of treatment or prevention of a disease or medical condition in a mammal. Furthermore, the treatment or prevention provided by the method can include treatment or prevention of one or more conditions or symptoms of the disease or medical condition. For example, with regard to methods of treating obesity, the method in some embodiments, achieves a decrease in food intake by or fat levels in a patient. Also, for purposes herein, "prevention" can encompass delaying the onset of the disease, or a symptom or condition thereof.

[00266] With regard to the above methods of treatment, the patient is any host. In some embodiments, the host is a mammal. As used herein, the term “mammal” refers to any vertebrate animal of the mammalia class, including, but not limited to, any of the monotreme, marsupial, and placental taxas. In some embodiments, the mammal is one of the mammals of the order Rodentia, such as mice and hamsters, and mammals of the order Logomorpha, such as rabbits. In certain embodiments, the mammals are from the order Carnivora, including Felines (cats) and Canines (dogs). In certain embodiments, the mammals are from the order Artiodactyla, including Bovines (cows) and S wines (pigs) or of the order Perssodactyla, including Equines (horses). In some instances, the mammals are of the order Primates, Ceboids, or Simoids (monkeys) or of the order Anthropoids (humans and apes). In particular embodiments, the mammal is a human.

Kits

[00267] The glucagon analogs of the present disclosure can be provided in accordance with one embodiment as part of a kit. Accordingly, in some embodiments, a kit for administering a glucagon analog, e.g., a glucagon agonist peptide, to a patient in need thereof is provided wherein the kit comprises a glucagon analog as described herein.

[00268] In one embodiment the kit is provided with a device for administering the glucagon composition to a patient, e.g.,syringe needle, pen device, jet injector or other needle-free injector. The kit may alternatively or in addition include one or more containers, *e.g.*, vials, tubes, bottles, single or multi-chambered pre-filled syringes, cartridges, infusion pumps (external or implantable), jet injectors, pre-filled pen devices and the like, optionally containing the glucagon analog in a lyophilized form or in an aqueous solution. The kits in some embodiments comprise instructions for use. In accordance with one embodiment the device of the kit is an aerosol dispensing device, wherein the composition is prepackaged within the aerosol device. In another embodiment the kit comprises a syringe and a needle, and in one embodiment the sterile glucagon composition is prepackaged within the syringe.

[00269] The following examples are given merely to illustrate the present invention and not in any way to limit its scope.

EXAMPLES

EXAMPLE 1

[00270] *Synthesis of peptide fragments of glucagon*

[00271] *Materials:*

[00272] All peptides described herein in the EXAMPLES were amidated unless specified otherwise.

[00273] MBHA resin (4-methylbenzhydrylamine polystyrene resin was used during peptide synthesis. MBHA resin, 100-180 mesh, 1% DVB cross-linked polystyrene; loading of 0.7-1.0 mmol/g), Boc-protected and Fmoc protected amino acids were purchased from Midwest Biotech. The solid phase peptide syntheses using Boc-protected amino acids were performed on an Applied Biosystem 430A Peptide Synthesizer. Fmoc protected amino acid synthesis was performed using the Applied Biosystems Model 433 Peptide Synthesizer.

[00274] *Peptide synthesis (Boc amino acids/ HF cleavage):*

[00275] Synthesis of these analogs was performed on the Applied Biosystem Model 430A Peptide Synthesizer. Synthetic peptides were constructed by sequential addition of amino acids to a cartridge containing 2 mmol of Boc protected amino acid. Specifically, the synthesis was carried out using Boc DEPBT-activated single couplings. At the end of the coupling step, the peptidyl-resin was treated with TFA to remove the N-terminal Boc

protecting group. It was washed repeatedly with DMF and this repetitive cycle was repeated for the desired number of coupling steps. After the assembly, the sidechain protection, Fmoc, was removed by 20% piperidine treatment and acylation was conducted using DIC. The peptidyl-resin at the end of the entire synthesis was dried by using DCM, and the peptide was cleaved from the resin with anhydrous HF.

[00276] For the lactamization, orthogonal protecting groups were selected for Glu and Lys (e.g.,Glu(Fm), Lys(Fmoc)). After removal of the protecting groups and before HF cleavage, cyclization was performed as described previously (see, e.g., International Patent Application Publication No. WO2008/101017).

[00277] *HF treatment of the peptidyl-resin*

[00278] The peptidyl-resin was treated with anhydrous HF, and this typically yielded approximately 350 mg (~50% yield) of a crude deprotected-peptide. Specifically, the peptidyl-resin (30mg to 200mg) was placed in the hydrogen fluoride (HF) reaction vessel for cleavage. 500 μL of p-cresol was added to the vessel as a carbonium ion scavenger. The vessel was attached to the HF system and submerged in the methanol/dry ice mixture. The vessel was evacuated with a vacuum pump and 10 ml of HF was distilled to the reaction vessel. This reaction mixture of the peptidyl-resin and the HF was stirred for one hour at 0° C, after which a vacuum was established and the HF was quickly evacuated (10-15 min). The vessel was removed carefully and filled with approximately 35 ml of ether to precipitate the peptide and to extract the p-cresol and small molecule organic protecting groups resulting from HF treatment. This mixture was filtered utilizing a teflon filter and repeated twice to remove all excess cresol. This filtrate was discarded. The precipitated peptide dissolves in approximately 20 ml of 10% acetic acid (aq). This filtrate, which contained the desired peptide, was collected and lyophilized.

[00279] An analytical HPLC analysis of the crude solubilized peptide was conducted under the following conditions [4.6 X 30 mm Xterra C8, 1.50 mL/min, 220 nm, A buffer 0.1% TFA/10% ACN, B buffer 0.1% TFA/100% ACN, gradient 5-95%B over 15 minutes]. The extract was diluted twofold with water and loaded onto a 2.2 X 25 cm Vydac C4 preparative reverse phase column and eluted using an acetonitrile gradient on a Waters HPLC system (A buffer of 0.1% TFA/10% ACN, B buffer of 0.1% TFA/10% CAN and a gradient of 0-100% B over 120 minutes at a flow of 15.00 ml/min. HPLC analysis of the purified peptide demonstrated greater than 95% purity and electrospray ionization mass spectral analysis was used to confirm the identity of the peptide.

[00280] *Peptide Acylation*

[00281] Acylated peptides were prepared as follows. Peptides were synthesized on a solid support resin using either a CS Bio 4886 Peptide Synthesizer or Applied Biosystems 430A Peptide Synthesizer. In situ neutralization chemistry was used as described by Schnolzer et al., Int. J. Peptide Protein Res. 40: 180-193 (1992). For acylated peptides, the target amino acid residue to be acylated (e.g., position ten, relative to the amino acid position numbering of SEQ ID NO: 3) was substituted with an N ε -FMOC lysine residue. Treatment of the completed N-terminally BOC protected peptide with 20% piperidine in DMF for 30 minutes removed FMOC/formyl groups. Coupling to the free ε-amino Lys residue was achieved by coupling a ten-fold molar excess of either an FMOC-protected spacer amino acid (ex. FMOC-Glu-OtBu) or acyl chain (ex. $CH_3(CH_2)_{14}$-COOH)and PyBOP or DEPBT coupling reagent in DMF/DIEA. Subsequent removal of the spacer amino acid's FMOC group is followed by repetition of coupling with an acyl chain. Final treatment with 100% TFA resulted in removal of any side chain protecting groups and the N-terminal BOC group. Peptide resins were neutralized with 5% DIEA/DMF, dried, and then cleaved from the support using HF/p-cresol, 95:5, at 0°C for one hour. Following ether extraction, a 5% HOAc solution was used to solvate the crude peptide. A sample of the solution was then verified to contain the correct molecular weight peptide by ESI-MS. Correct peptides were purified by RP-HPLC using a linear gradient of 10% CH3CN/0.1% TFA to 0.1% TFA in 100% CH3CN. A Vydac C18 22 mm x 250 mm protein column was used for the purification. Acylated peptide analogs generally completed elution by a buffer ratio of 20:80. Portions were pooled together and checked for purity on an analytical RP-HPLC. Pure fractions were lyophilized yielding white, solid peptides.

[00282] If a peptide comprised a lactam bridge and target residues to be acylated, acylation is carried out as described above upon addition of that amino acid to the peptide backbone.

[00283] *Peptide PEGylation*

[00284] For peptide PEGylation, 40 kDa methoxy poly(ethylene glycol) idoacetamide (NOF) was reacted with a molar equivalent of peptide in 7M Urea, 50mM Tris-HCl buffer using the minimal amount of solvent needed to dissolve both peptide and PEG into a clear solution (generally less than 2 mL for a reaction using 2-3 mg peptide). Vigorous stirring at room temperature commenced for 4-6 hours and the reaction analyzed by analytical RP-HPLC. PEGylated products appeared distinctly from the starting material with decreased retention times. Purification was performed on a Vydac C4 column with conditions similar to those used for the initial peptide purification. Elution occurred

around buffer ratios of 50:50. Fractions of pure PEGylated peptide were found and lyophilized. Yields were above 50%, varying per reaction.

[00285] *Analysis using mass spectrometry*

[00286] The mass spectra were obtained using a Sciex API-III electrospray quadrapole mass spectrometer with a standard ESI ion source. Ionization conditions that were used are as follows: ESI in the positive-ion mode; ion spray voltage, 3.9 kV; orifice potential, 60 V. The nebulizing and curtain gas used was nitrogen flow rate of .9 L/min. Mass spectra were recorded from 600-1800 Thompsons at 0.5 Th per step and 2 msec dwell time. The sample (about 1mg/mL) was dissolved in 50% aqueous acetonitrile with 1% acetic acid and introduced by an external syringe pump at the rate of 5 μL/min.

[00287] When the peptides were analyzed in PBS solution by ESI MS, they were first desalted using a ZipTip solid phase extraction tip containing 0.6 μL C4 resin, according to instructions provided by the manufacturer (Millipore Corporation, Billerica, MA, see the Millipore website of the world wide web at millipore.com/catalogue.nsf/docs/C5737).

[00288] *High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis:*

[00289] Preliminary analyses were performed with these crude peptides to get an approximation of their relative conversion rates in Phosphate Buffered Saline (PBS) buffer (pH, 7.2) using high performance liquid chromatography (HPLC) and MALDI analysis. The crude peptide samples were dissolved in the PBS buffer at a concentration of 1 mg/ml. 1 ml of the resulting solution was stored in a 1.5 ml HPLC vial which was then sealed and incubated at 37 °C. Aliquots of 100μl were drawn out at various time intervals, cooled to room temperature and analyzed by HPLC.

[00290] The HPLC analyses were performed using a Beckman System Gold Chromatography system using a UV detector at 214 nm. HPLC analyses were performed on a 150 mm x 4.6 mm C18 Vydac column. The flow rate was 1 ml/min. Solvent A contained 0.1% TFA in distilled water, and solvent B contained 0.1% TFA in 90% CH3CN. A linear gradient was employed (40% to 70%B in 15 minutes). The data were collected and analyzed using Peak Simple Chromatography software.

[00291] The initial rates of hydrolysis were used to measure the rate constant for the dissociation of the respective prodrugs. The concentrations of the prodrug and the drug were estimated from their peak areas respectively. The first order dissociation rate constants of the prodrugs were determined by plotting the logarithm of the concentration of the prodrug at various time intervals. The slope of this plot gives the rate constant 'k'.

The half lives of the degradation of the various prodrugs were then calculated by using the formula t1/2 = .693/k.

EXAMPLE 2

[00292] *Synthesis of the Peptide of Seq ID No. 17*

[00293] The peptide seq ID no. 17 was synthesized by solid phase using Fmoc/t-Bu chemistry. For the preparation of the peptide, 0.5 g of 2-Chlorotrityl-resin (100-200 mesh, 1.18 mmol/g) (GL Biochem) were first derivatized by incubation with 0.8 equivalents (eq.). Fmoc-Gln(Trt)-OH, 4 eq. relative to amino acid diisopropylethylamine (DIPEA) in dry DCM (dichloromethane) for 2 hours. The peptide sequence assembly was then performed on a peptide multisynthesizer APEX396 (Advanced Biotech). All the amino acids were dissolved at a 0.5M concentration in DMF (N,N-dimethyl formamide). The acylation reactions were performed for 60 min with 6-fold excess of activated amino acid over the resin free amino groups. Double acylations were performed for Aib2, Aib16, Asp15, His1. The amino acids were activated with equimolar amounts of HATU (2-(1H-7-Azabenzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl uronium hexafluorophosphate), solution 0.5 M in DMF, and a 2-fold molar excess of DIEA (N,N-diisopropylethylamine), solution 2 M in NMP (1-methyl-2-pyrrolidinone).

[00294] The side chain protecting groups were: tert-butyl for Asp and Glu, Ser, Thr and Tyr; trityl for Asn, Gln and His; tert-butoxy-carbonyl for Lys, Trp; and, 2,2,4,6,7-pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl for Arg; Boc-His(Trt)-OH was used in the synthesis.

[00295] The lysine at position 10, to be derivatized on the side chain, was incorporated as Lys(Alloc). At the end of the assembly the Alloc protecting group was removed and the synthesis was completed by condensation of the two γ-carboxyglutamic acid residues (4 eq.) and the palmitic acid (4 eq.) using HBTU (4 eq.; (O-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tetramethyluronium hexafluorophosphate), and DIPEA (8 eq.) as activators.

[00296] At the end of the synthesis, the dry peptide-resins were individually treated with 25 mL of the cleavage mixture, 88% trifluoroacetic acid (TFA), 5% phenol, 2% triisopropylsilane and 5% water for 2 hours at room temperature. The resin was filtered and the volume of the solution was reduced then added to cold methyl-t-butyl ether in order to precipitate the peptide. After centrifugation, the peptide pellets were washed with fresh cold methyl-t-butyl ether to remove the organic scavengers. The process was

repeated twice. Final pellets were dried, resuspended in H_2O, 20% acetonitrile, and lyophilized.

[00297] The crude peptides were purified by reverse-phase HPLC using preparative Waters XBridge C18 (50 x 150 mm, 5 μm) and using as eluents (A) 0.1% TFA in water and (B) 0.1% TFA in acetonitrile. Analytical UPLC was performed on a Waters Chromatograph, with a BEH130, C18 Acquity , 1.7 μm column, 2.1 x 100 mm, (Waters), at 45 °C, using H_2O, 0.1% TFA (A) and CH_3CN, 0.1% TFA (B) as solvents. The purified peptide was characterized by electrospray mass spectrometry on a Waters SQ Detector.

EXAMPLE 3

[00298] The ability of each peptide to induce cAMP was measured in a firefly luciferase-based reporter assay. The cAMP production that is induced is directly proportional to the glucagon fragment binding to the glucagon or GLP-1 receptor. HEK293 cells co-transfected with the glucagon or GLP-1 receptor, respectively, and luciferase gene linked to a cAMP responsive element were employed for the bioassay.

[00299] The cells were serum-deprived by culturing 16 hours in Dulbecco-modified Minimum Essential Medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 0.25% Bovine Growth Serum (HyClone, Logan, UT) and then incubated with serial dilutions of glucagon fragments for 5 hours at 37 oC, 5% CO2 in 96 well poly-D-Lysine-coated "Biocoat" plates (BD Biosciences, San Jose, CA). At the end of the incubation, 100 μL of LucLite luminescence substrate reagent (Perkin Elmer, Wellesley, MA) were added to each well. The plate was shaken briefly, incubated 10 min in the dark and light output was measured on MicroBeta-1450 liquid scintillation counter (Perkin-Elmer, Wellesley, MA). The effective 50% concentrations (EC50) were calculated by using Origin software (OriginLab, Northampton, MA).

EXAMPLE 4

[00300] The *in* vitro agonist potencies of the peptide of SEQ ID NO. 17 were determined using Chinese Hamster Ovary cells (CHO-K1) stably expressing human GLP-1R, GCGR or GIPR. The GLP-1R and GCGR stable cell line isogenic pools were generated by Invitrogen™ using their Jump-In™ targeted integration technology, whereas the stable CHO/GIPR lines were generated through classic cloning and transfection techniques (random integration) with limited dilution for selection of clones.

The peptides were tested *in vitro* for their relative abilities to stimulate cAMP production in the various cell lines using the DiscoveRx Hithunter™ cAMP XS+ assay kit (cat# 90-0075L) as per kit instructions. The peptide 50% effective concentrations (EC50s) were calculated by non-linear regression analysis 4-parameter curve fitting with GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, San Diego, CA) by plotting luminescence values versus peptide doses.

EXAMPLE 5

[00301] Peptides having the amino acid sequences as described in the sequence listing were made as essentially described in Example 1 or 2 and subsequently tested for in vitro agonist activity at each of the glucagon receptor and GLP-1 receptor as essentially described in Example 3 or 4. In some instances, the in vitro agonist activity at the GIP receptor was also tested. The results are shown below in Table 1.

TABLE 1

SEQ ID NO:	Sequence	EC50 (nM) at glucagon receptor	EC50 (nM) at GLP-1 receptor	EC50 (nM) at GIP receptor
12	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDAibRAAQDFVQWLMDTKγGlu-amide	0.010	0.003	12.763
13	HaibQGTFTSDYSKYLDERRAaibEFVC(40K-TE PEG)WLLDTKγE-amide	2.806	0.567	139.639
14	HsQGTFTSDK(γGlu-C16)SKYLDERAAQDFVQWLLDTKγGlu-amide	0.003	0.003	976
15	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLMornDTKQ-acid	0.006	0.005	1.901
16	HaibQGTFTSDK(γGlu-γGlu-C16)SKYLDaibRAAQDFVQWLLDTKQ-acid	0.015	0.019	1.038
17	H aib QGTFTSD K(γGlu-γGlu-C16) SKYLD aib RAAQDFVQWLMNTKγGlu-amide	0.11	0.075	> 2000

The EC_{50} values for the peptides of SEQ ID Nos. 12 – 16 were obtained using the procedure of Example 3. The EC_{50} value for the peptide of SEQ ID NO 17 was obtained using the procedure of Example 4.

[00302] As shown in Table 1, many of the peptides exhibit an EC50 at the GLP-1 receptor in the nanomolar or picomolar range.

EXAMPLE 6

[00303] Diet induced obesity (DIO) mice are divided into groups of eight mice per group and the initial average body weight of each group is determined. Each group of mice is subcutaneously injected daily with a dose of a peptide or vehicle control for one week. The peptides tested in this study were the peptides of SEQ ID NOs: 12-16. The administered doses varied between 1 and 10 nmol/kg for each of the peptides tested. Body weight, body composition, food intake, and blood glucose levels were determined periodically throughout the test period.

[00304] To better determine the effect of these peptides on blood glucose levels, a second experiment with db/db mice are performed. In this experiment, db/db mice are divided into groups of eight mice per group and the initial average body weight of each group is determined. Each group of mice is subcutaneously injected with a single dose of a peptide of one of SEQ ID NOs: 12-16, wherein the dose is within the range of 3 and 30 nmole/kg. Body weight, body composition, food intake, and blood glucose levels were determined periodically throughout the test period.

EXAMPLE 7

[00305] The *in vivo* effects of certain peptides of the invention were confirmed in diet-induced obese (DIO) mice that were maintained on a high fat diet for 16 weeks and had an initial body weight of ~ 47 g. Mice were administered a vehicle control or a dose of a peptide daily for nine days. The peptides tested in this study included a peptide of SEQ ID NO: 12, a peptide of SEQ ID NO: 17, a peptide of SEQ ID NO: 18, and a peptide of SEQ ID NO: 19. Doses of each peptide were varied – each of the peptides of SEQ ID NO: 12, 17, and 19 was administered at a dose of either 3 nmol/kg or 9 nmol/kg, while the peptide of SEQ ID NO: 18 was administered at a dose of 1 nmol/kg, 3 nmol/kg, or 9 nmol/kg. Cumulative body weight change (in grams) was measured each day of the study and the results are shown in Figure 1. Data are expressed as mean ± SEM.

[00306] Each of the peptides tested in this study demonstrated a body-weight lowering effect. Each group of mice that were administered a peptide at a 3 nmol/kg dose or a 9 nmol/kg dose demonstrated a decreased body weight (as compared to vehicle-treated

mice) as early as Day 1 of the study. On Day 9 of the study, mice that were administered 3 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 12 exhibited an approximate 5.3% body weight reduction, while mice that were administered 9 nmol/kg dose of the peptide of SEQ ID NO: 12 exhibited an approximate 29.8% body weight loss. On Day 9 of the study, mice that were administered 3 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 17 exhibited an approximate 9.6% body weight reduction, while mice that were administered 9 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 17 demonstrated an approximate 35.5% weight loss. On Day 9 of the study, mice that were administered 3 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 18 exhibited an approximate 12.3% body weight reduction, while mice that were administered 9 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 18 demonstrated an approximate 26.8% body weight loss. On Day 9 of this study, mice that were administered 3 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 19 demonstrated an approximate 8.1% body weight reduction, whereas mice that were administered 9 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 19 exhibited an approximate 31.5% body weight loss.

[00307] In addition to cumulative body weight change, ambient glucose levels of the DIO mice were measured. As shown in Figure 2, mice that were administered a 3 nmol/kg or a 9 nmol/kg dose of the peptide of SEQ ID NO: 18 demonstrated a significant decrease in ambient glucose by Day 4 (-29% vs. vehicle; $P < 0.05$). Mice that were given 9 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 19 demonstrated an approximate 40% decrease in glucose levels on Day 4 (compared to vehicle control mice; $P < 0.05$), an approximate 39% decrease in glucose levels on Day 7 (compared to vehicle control mice; $P < 0.05$), and an approximate 26% decrease in glucose levels on Day 9 (compared to vehicle control mice; $P < 0.05$).

[00308] Mice that were given 9 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 17 demonstrated an approximate 48% decrease in glucose levels on Days 4 and 7 (compared to vehicle control mice; $P < 0.05$), an approximate 45% decrease in glucose levels on Day 9 (as compared to vehicle control mice; $P < 0.05$). Mice that were given 3 nmol/kg of the peptide of SEQ ID NO: 17 demonstrated an approximate 28% reduction in glucose levels on Day 7 (as compared to vehicle control mice; $P < 0.05$) and an approximate 19% decrease in glucose levels on Day 9 (as compared to vehicle control mice; $P < 0.05$).

EXAMPLE 8

[00309] The *in vivo* effects of a peptide of the invention were confirmed in obese rhesus monkeys by administering daily for 21 days a vehicle control, a commercially available product (Liraglutide), a peptide of SEQ ID NO: 20, or a peptide of SEQ ID NO: 17. Liraglutide was administered at a dose of 20 µg/kg s.c., while each of the peptides of SEQ ID NO: 17 and SEQ ID NO: 20 was administered at a dose of 3 µg/kg s.c. All peptides have comparable pharmacokinetic (t1/2 ~10 h) and similar plasma protein binding in rhesus monkeys (> 98%). Body weight and food intake were measured.

[00310] As shown in Figure 3A, obese monkeys that were administered the peptide of SEQ ID NO: 17 exhibited superior weight loss (-1.2 kg vs. baseline and vehicle, $P < 0.05$), compared to Liraglutide and to the peptide of SEQ ID NO: 20.

[00311] A significant decrease in food intake (expressed as % change vs. baseline in Figure 3B), was observed following treatment with liraglutide (-13.1 ± 1.9%) or with the peptide of SEQ ID NO: 17 (-25.7% ± 3.2%, $P < 0.05$ vs. Liraglutide). Following a one week wash-out, the animals treated with the peptide of SEQ ID NO: 17 regained much of the weight that was lost during the chronic treatment (Day 28). In Figures 3A and 3B, the data are expressed as mean ± SEM. * $P < 0.05$ vs vehicle, ^$P < 0.05$ peptide of SEQ ID NO: 17 vs. Liraglutide.

EXAMPLE 9

[00312] The *in vivo* effects of a peptide of the invention were tested in diabetic rhesus monkeys (n=7) that were aged 16-26 years and having an average body weight of ~22 kg. Diabetic rhesus monkeys (n=7) that were aged 16-26 years with an average body weight of ~22 kg were administered a vehicle control, Liraglutide at a dose of 10 µg/kg s.c. or a peptide of SEQ ID NO: 17 at a dose of 1 µg/kg s.c. for 10 days.

[00313] Body weight was measured during the study and it was found that no body weight effect was observed in thse animals during the treatment period.

[00314] At the end of each treatment, fasting blood glucose (FBG) was measured first followed by a Meal Tolerance Test (MTT) to assess glucose tolerance. As shown in Figure 4, diabetic monkeys treated with the peptide of SEQ ID NO: 17 demonstrated a significantly decreased FBG (120 ± 20 vs. 158 ± 15 mg/mL, peptide of SEQ ID NO: 17 vs. vehicle (-25%), P<0.05; Figure 4). Also, the monkeys treated with the peptide of SEQ ID NO: 17 demonstrated an improved glucose tolerance during MTT as compared to

vehicle control monkeys (Figure 4). Data are expressed in Figure 4 as mean ± SEM. *$P <$ 0.05 versus vehicle.

[00315] All references, including publications, patent applications, and patents, cited herein are hereby incorporated by reference to the same extent as if each reference were individually and specifically indicated to be incorporated by reference and were set forth in its entirety herein.

[00316] The use of the terms "a" and "an" and "the" and similar referents in the context of describing the invention (especially in the context of the following claims) are to be construed to cover both the singular and the plural, unless otherwise indicated herein or clearly contradicted by context. The terms "comprising," "having," "including," and "containing" are to be construed as open-ended terms (i.e., meaning "including, but not limited to,") unless otherwise noted.

[00317] Recitation of ranges of values herein are merely intended to serve as a shorthand method of referring individually to each separate value falling within the range and each endpoint, unless otherwise indicated herein, and each separate value and endpoint is incorporated into the specification as if it were individually recited herein.

[00318] All methods described herein can be performed in any suitable order unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context. The use of any and all examples, or exemplary language (e.g., "such as") provided herein, is intended merely to better illuminate the invention and does not pose a limitation on the scope of the invention unless otherwise claimed. No language in the specification should be construed as indicating any non-claimed element as essential to the practice of the invention.

[00319] Preferred embodiments of this invention are described herein, including the best mode known to the inventors for carrying out the invention. Variations of those preferred embodiments may become apparent to those of ordinary skill in the art upon reading the foregoing description. The inventors expect skilled artisans to employ such variations as appropriate, and the inventors intend for the invention to be practiced otherwise than as specifically described herein. Accordingly, this invention includes all modifications and equivalents of the subject matter recited in the claims appended hereto as permitted by applicable law. Moreover, any combination of the above-described elements in all possible variations thereof is encompassed by the invention unless otherwise indicated herein or otherwise clearly contradicted by context.

Claims:

1. A peptide comprising or consisting of the amino acid sequence of :

a) SEQ ID NO: 17;

b) SEQ ID NO: 12;

c) SEQ ID NO: 13;

d) SEQ ID NO: 14;

e) SEQ ID NO: 15, or

f) SEQ ID NO: 16;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

2. The peptide of Claim 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 17, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

3. The peptide of Claim 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 12, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

4. The peptide of Claim 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 13, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

5. The peptide of Claim 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 14, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

6. The peptide of Claim 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 15, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

7. The peptide of Claim 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 16, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

8. A variant peptide comprising an amino acid sequence that is at least 85%, 90%, or 95% identical to the amino acid sequence of the peptide of Claim 1, said variant peptide differing from the amino acid sequence of the peptide of claim 1 in that the variant peptide comprises one or more of the following features:

a. an acylated amino acid or an alkylated amino acid at position 10;

b. an acylated amino acid or an alkylated amino acid is replaced with the corresponding amino acid of native glucagon (SEQ ID NO: 1) at that position or a conservative substitution of the native amino acid, and optionally a new acylated or alkylated amino acid is introduced at a different position;

c. the variant peptide comprises an amino acid covalently attached to a hydrophilic moiety at position 24;

d. an amino acid covalently attached to a hydrophilic moiety is replaced with the corresponding amino acid of native glucagon (SEQ ID NO: 1) at that position, and optionally a new amino acid covalently attached to a hydrophilic moiety is introduced at a different position;

e. the C-terminal amino acid of the variant peptide comprises a C-terminal amide in place of a C-terminal alpha carboxylate;

f. an amino acid at any of positions 1 through 29 is replaced with the corresponding amino acid of native glucagon (SEQ ID NO: 1) at that position;

g. or any combinations thereof;

or a pharmaceutically acceptable salt thereof,

wherein the variant peptide exhibits enhanced activity at the GLP-1 receptor, as compared to native glucagon, and exhibits at least 100-fold greater selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

9. The variant peptide of Claim 8, comprising a hydrophilic moiety covalently attached to an amino acid at position 16, 17, 21, 24, 29, a position within a C-terminal extension, or at the C-terminus, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

10. The variant peptide of Claim 8, comprising a Cys, Lys, Orn, homocysteine, and Ac-Phe covalently attached to a hydrophilic moiety, optionally, wherein

the Cys, Lys, Orn, homocysteine, and Ac-Phe is located at position 16, 17, 21, 24, 29, a position within a C-terminal extension, or at the C-terminus of the variant peptide , or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

11. The variant peptide of any one of Claims 8 to 10, wherein the hydrophilic moiety is a polyethylene glycol, optionally, a PEG of molecular weight between 10 kDa and 40 kDa, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

12. The variant peptide of any one of Claims 8 to 11, comprising an acylated or alkylated amino acid which comprises a C8 to C20 alkyl chain, a C12 to C18 alkyl chain, or a C14 or C16 alkyl chain, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

13. The variant peptide of any one of Claims 8 to 12, comprising an acylated or alkylated amino acid which an acylated or alkylated amino acid of Formula I, Formula II, or Formula III, optionally, wherein the amino acid of Formula I is Lys, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

14. The variant peptide of any one of Claims 8 to 13, comprising an acylated or alkylated amino acid, wherein the acyl group or alkyl group is covalently attached to the amino acid via a spacer, optionally, wherein the spacer is an amino acid or a dipeptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

15. The variant peptide of Claim 14, wherein the spacer comprises one or two acidic residues, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

16. The peptide or variant peptide of any one of the preceding claims, wherein the

$$\frac{\text{(EC50 at the glucagon receptor)}}{\text{(EC50 at the GLP-1 receptor)}}$$

is about 20 or less, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

17. The peptide or variant peptide of any one of the preceding claims, which exhibits an EC50 at the GLP-1 receptor which is two- to ten-fold greater than the EC50 at the glucagon receptor, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

18. A conjugate comprising a peptide or variant peptide of any one of the preceding claims conjugated to a heterologous moiety, or a pharmaceutically acceptable salt

thereof, wherein the conjugate exhibits enhanced activity at the GLP-1 receptor, as compared to native glucagon, and exhibits at least 100-fold greater selectivity for the human GLP-1 receptor versus the GIP receptor.

19. The conjugate of Claim 18, wherein the heterologous moiety comprises one or more of: a peptide, a polypeptide, a nucleic acid molecule, an antibody or fragment thereof, a polymer, a quantum dot, a small molecule, a toxin, a diagonostic agent, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

20. The conjugate of Claim 19, wherein the heterologous moiety is a peptide and conjugate is a fusion peptide or a chimeric peptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

21. The conjugate of Claim 20, comprising an extension of 1-21 amino acids C-terminal to the amino acid at position 31 of the peptide or variant peptide, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

22. The conjugate of Claim 21, wherein the extension is selected from the group consisting of: Gly, Glu, Cys, Gly-Gly, Gly-Glu, GPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 9) or GGPSSGAPPPS (SEQ ID NO: 10) , or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

23. A dimer or multimer comprising a peptide or variant peptide of any one of the preceding claims, or a pharmaceutically acceptable salt thereof.

24. A pharmaceutical composition comprising the peptide or variant peptide of any one of the preceding claims, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a conjugate of Claim 18 to 22, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a dimer or multimer of Claim 23, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; or a combination thereof, and a pharmaceutically acceptable carrier.

25. The pharmaceutical composition of claim 24, comprising an anti-diabetic or anti-obesity agent.

26. A method of treating a disease or medical condition in a patient, wherein the disease or medical condition is selected from the group consisting of: metabolic syndrome, diabetes, obesity, liver steatosis, and a neurodegenerative disease, comprising administering to the patient the pharmaceutical composition of Claim 24 or 25 in an amount effective to treat the disease or medical condition.

27. The method of claim 26, further comprising administering to the patient an anti-diabetic or anti-obesity agent.

28. Use of the peptide or variant peptide of any one of the preceding claims, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a conjugate of Claim 18 to 22, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a dimer or multimer of Claim 23, or a combination thereof for treating a disease or medical condition.

29. Use of the peptide or variant peptide of any one of the preceding claims, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a conjugate of Claim 18 to 22, or a pharmaceutically acceptable salt thereof; a dimer or multimer of Claim 23, or a combination thereof in the manufacture of a medicament to treat a disease or medical condition.

30. The use of claim 28 or 29, wherein the disease or medical condition is selected from the group consisting of: metabolic syndrome, diabetes, obesity, liver steatosis, and a neurodegenerative disease.

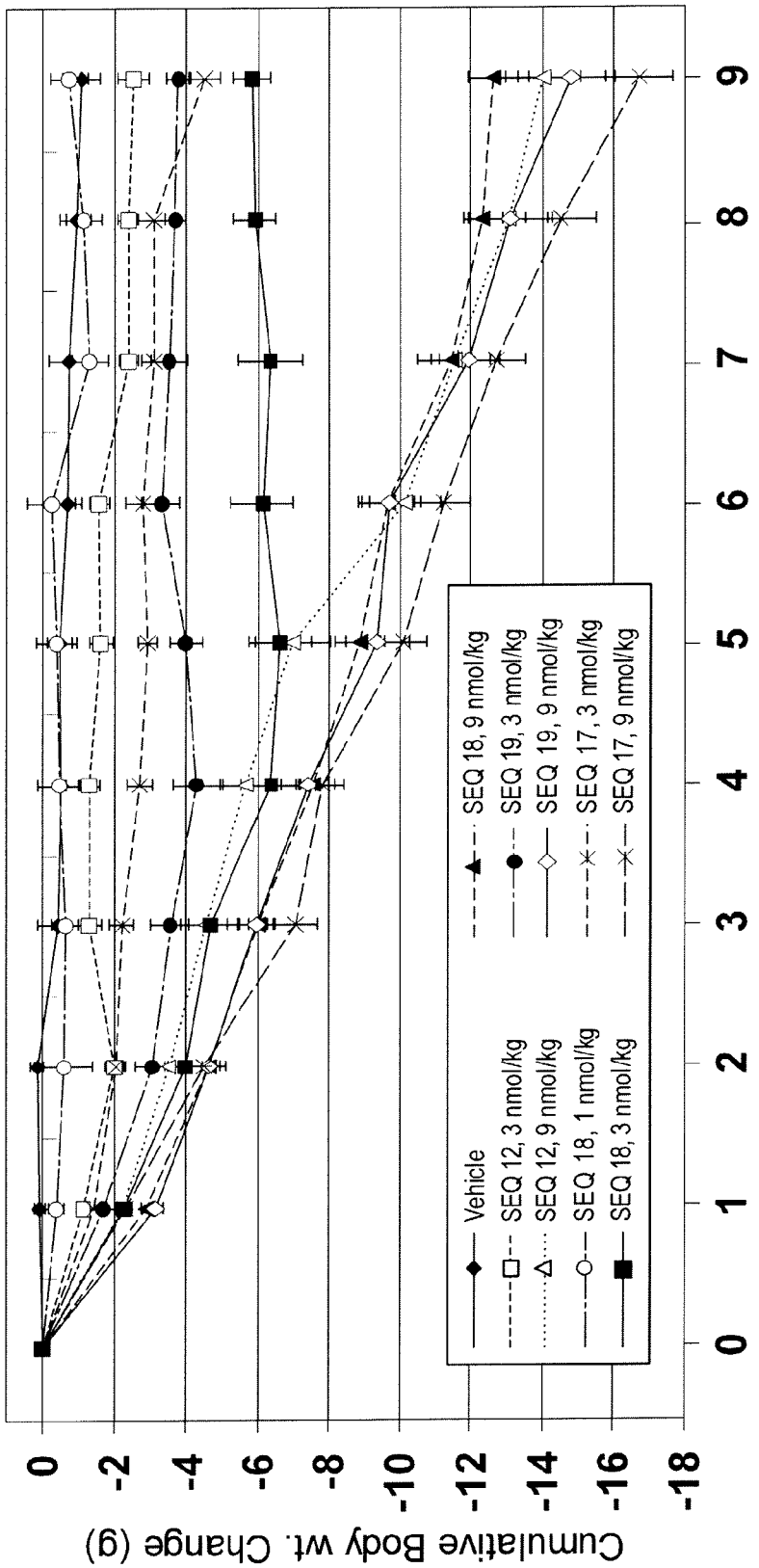

Cumulative Body wt. Change (g)
0
-2
-4
-6
-8
-10
-12
-14
-16
-18
Day
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
Vehicle
SEQ 12, 3 nmol/kg
SEQ 12, 9 nmol/kg
SEQ 18, 1 nmol/kg
SEQ 18, 3 nmol/kg
SEQ 18, 9 nmol/kg
SEQ 19, 3 nmol/kg
SEQ 19, 9 nmol/kg
SEQ 17, 3 nmol/kg
SEQ 17, 9 nmol/kg

FIG. 1

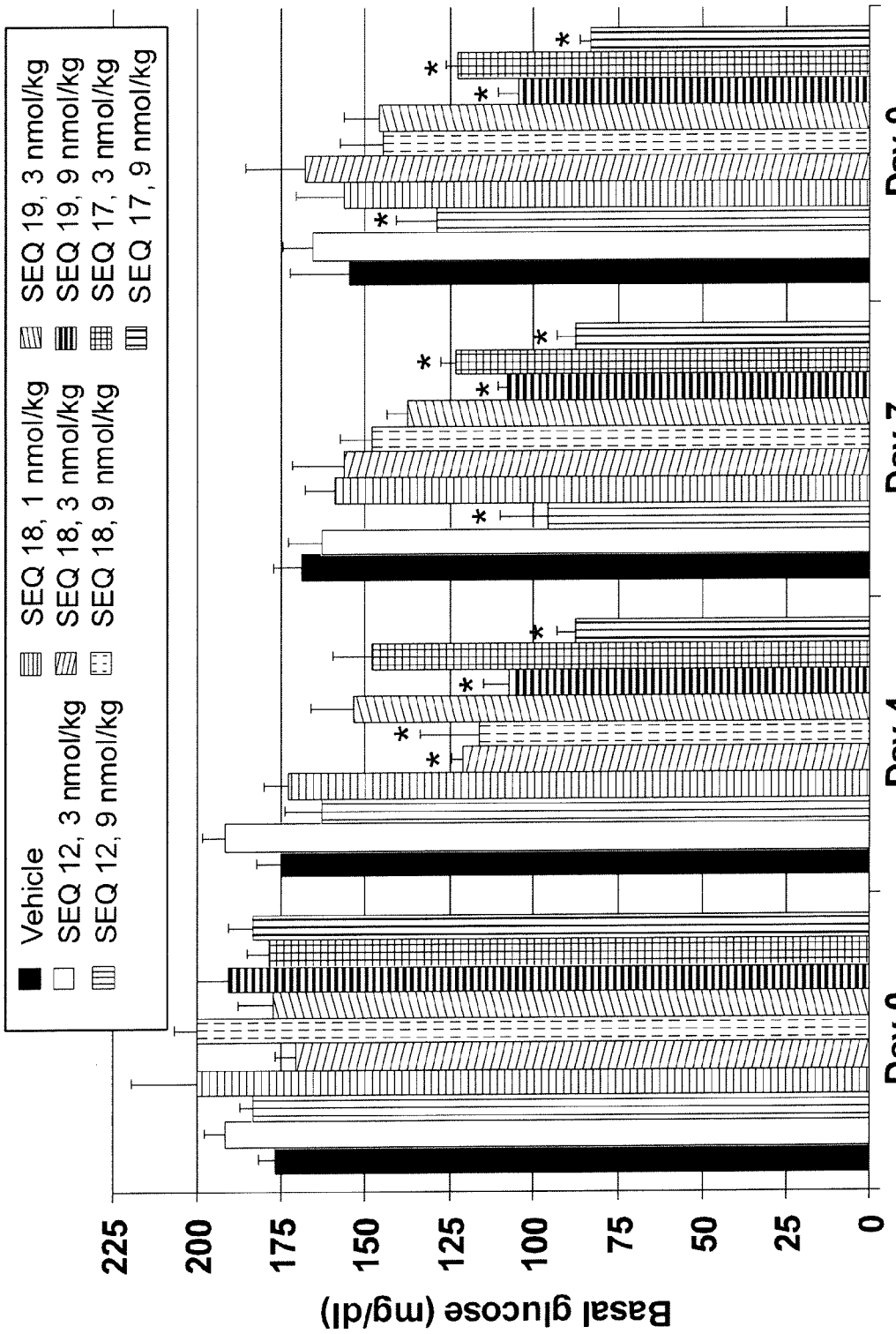

Vehicle
SEQ 12, 3 nmol/kg
SEQ 12, 9 nmol/kg
SEQ 18, 1 nmol/kg
SEQ 18, 3 nmol/kg
SEQ 18, 9 nmol/kg
SEQ 19, 3 nmol/kg
SEQ 19, 9 nmol/kg
SEQ 17, 3 nmol/kg
SEQ 17, 9 nmol/kg
Basal glucose (mg/dl)
225
200
175
150
125
100
75
50
25
0
Day 0
Day 4
Day 7
Day 9
* P < 0.05 vs. vehicle

FIG. 2

FIG. 3A

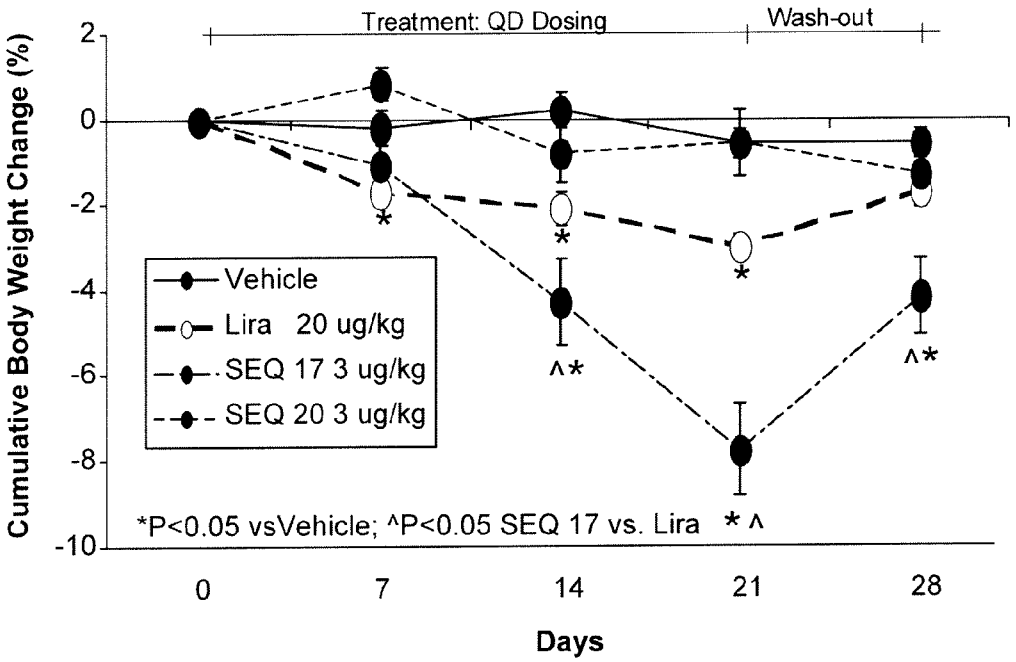
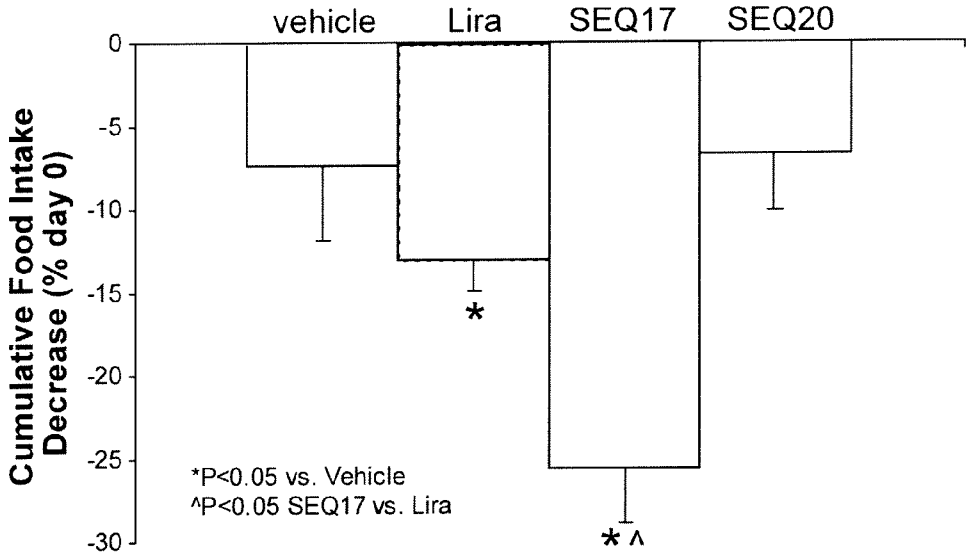

Treatment: QD Dosing
Wash-out
Cumulative Body Weight Change (%)
2
0
-2
-4
-6
-8
-10
Vehicle
Lira 20 ug/kg
SEQ 17 3 ug/kg
SEQ 20 3 ug/kg
*P<0.05 vsVehicle; ^P<0.05 SEQ 17 vs. Lira
0
7
14
21
28
Days

FIG. 3B


vehicle
Lira
SEQ17
SEQ20
Cumulative Food Intake Decrease (% day 0)
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
*P<0.05 vs. Vehicle
^P<0.05 SEQ17 vs. Lira

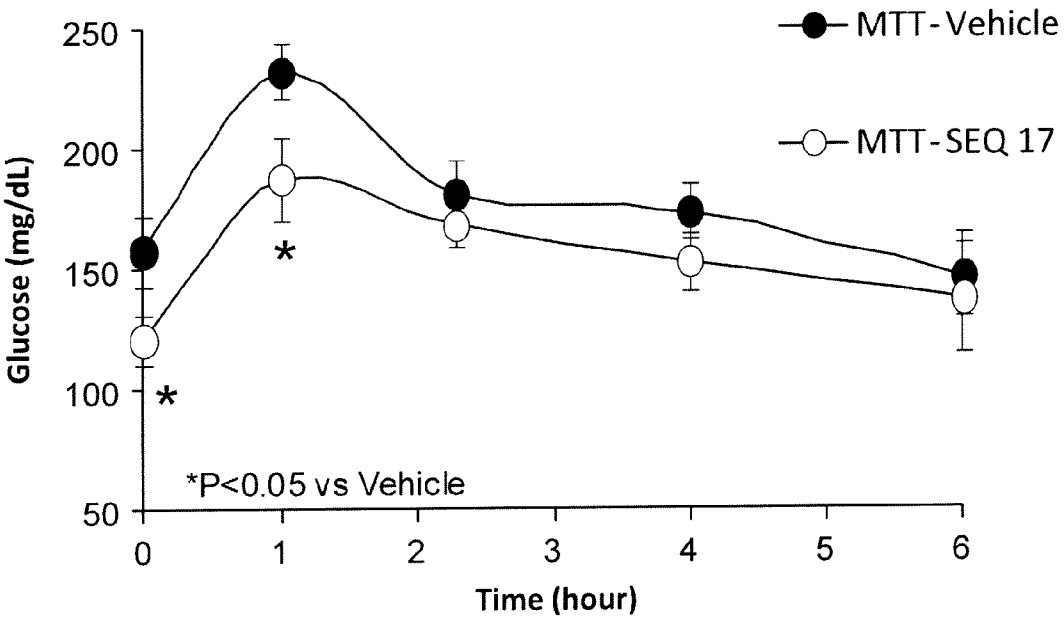

MTT-Vehicle
MTT-SEQ 17
Glucose (mg/dL)
250
200
150
100
50
*
*
*P<0.05 vs Vehicle
0
1
2
3
4
5
6
Time (hour)

FIG. 4

CECBA - LEY404 GCBA
LEGALIZACION
090728 329985
$35.00
12:47:55
28/07/2009

COLEGIO DE ESCRIBANOS · CIUDAD DE BUENOS AIRES · CAPITAL FEDERAL - REPÚBLICA ARGENTINA

ACTUACIÓN NOTARIAL
LEY 404

copia

N 011082583

FOLIO 1.318.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NUMERO SEISCIENTOS CUARENTA Y NUEVE.- En la Ciudad de Buenos Aires, Capital de la República Argentina, a veintidos de julio de dos mil nueve, ante mi, Escribano Autorizante, COMPARECE don **Daniel GOYTIA**, argentino, mayor de edad, casado, Libreta de Enrolamiento número 4.526.965, domiciliado en Bartolomé Mitre 226, 4° piso, de esta Ciudad.- El compareciente es persona de mi conocimiento, doy fe, así como que DICE: **I.-** Que por escritura de fecha 9 de abril de 2008, pasada ante mí al folio 932 del Protocolo de este Registro, al que me remito, doy fe, se protocolizó un **Poder** otorgado por **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION**, con domicilio en 351 West 10th Street, Indianapolis, IN 46202, US, a su favor, el que transcripto en sus partes pertinentes literalmente DICE: "... **Poder** - El abajo firmante - (1) - **INDIANA UNIVERSITY RESEARCH AND TECHNOLOGY CORPORATION** - Domiciliado en - (2) - 351 West 10th Street, Indianapolis, **IN** 46202, US, por el presente otorga a **DANIEL GOYTIA** domiciliado en Buenos Aires, Argentina, poder amplio y suficiente para recabar de las autoridades nacionales que corresponda, sean estas administrativas y/o judiciales, la obtención de **"Patentes, Marcas, Modelos, Diseños y sus renovaciones"** y realizar todos los trámites conducentes para proteger los derechos de la mandante, a cuyo efecto, los faculta para efectuar ante dichas autoridades nacionales, administrativas y/o judiciales todos los trámites necesarios a los objetos indicados; presentar solicitudes, alegatos, oposiciones, protestas, apelaciones y demandas; desistir, arreglar y transigir; aceptar cesiones y transferencias; solicitar testimonios; recibir documentos y otros valores; justificar explotaciones; cobrar y percibir; firmar instrumentos públicos, privados y escrituras públicas; para renunciar o no a las gestiones judiciales; y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades nacionales, judiciales y/o administrativas, sea

N 011082583

como demandante o como demandado, para proteger los intereses del mandante, con facultad de substituir este instrumento y revocar tal substitución. Se deja constancia que las facultades enumeradas en este mandato, son meramente ejemplificativas y no limitativas de otras facultades implícitas, por cuyo motivo, los mandatarios quedan autorizados para ejercer sin restricción alguna todos los derechos que acuerde la ley que se relacionen y/o emerjan y/o que sean consecuencia del objeto del presente poder y ya sea ello en razón de la legislación vigente y/o de la legislación que en el futuro se promulgue. Este documento es efectivo a partir del 31 de enero de 2008 ...".- LO TRANSCRIPTO ES COPIA FIEL, doy fe, de las partes pertinentes del mandato relacionado.- **II.-** Continúa diciendo el compareciente que viene por la presente a **SUSTITUIR** el citado mandato, reservándose para si las facultades, a favor de **"CARLOS TAMAYO & ASOCIADOS" y/o Carlos Orlando Maya Rodriguez y/o Gustavo Calderon Rosero y/o Carmen Graciela Florez y/o Clara Cortes Charry y/o Mayerling Rocio Castelblanco S.**, con domicilio en Carrera 13A Nº 28-38, Buffette 245, Manzana 02, Parque Central Bavaria, Bogotá, **COLOMBIA**, para actuar en dicho país con todas y cada una de las facultades enumeradas precedentemente.- LEIDA y ratificada, así lo expresó, otorgó, aceptó y firmó, por ante mi, doy fe.- "SIGUE UNA FIRMA".- Esta mi sello.- Ante mi: ALEJANDRO M. LIPORACE.- CONCUERDA con su matriz que pasó ante mi, al folio 1.318 del Protocolo del Registro 1331 a mi cargo.- PARA LOS APODERADOS expido esta **PRIMERA COPIA** en UNA FOJA de Actuación Notarial número N 011082583 que sello y firmo en el mismo lugar y fecha de su otorgamiento, doy fe.-

ALEJANDRO M. LIPORACE
Matricula 3837
ESCRIBANO PUBLICO

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA
NIHIL PRIUS FIDE

LEGALIZACION
LEY 404

L 008968001

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley orgánica vigente, LEGALIZA la firma y sello del escribano ~~ALEJANDRO MARIA LIPORACE~~ **obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo el Nº** ~~090728329985/4~~ **La presente legalización no juzga sobre el contenido y forma del documento.**

Buenos Aires, ~~Martes 28 de Julio de 2009~~

COLEGIO DE ESCRIBANOS
LEGALIZACION
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

ESC. RAQUEL COLOMER
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA

SERIE A 2597588

REPÚBLICA ARGENTINA

MINISTERIO *de*
RELACIONES EXTERIORES
COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

CANCILLERIA ARGENTINA

APOSTILLE
(Convention de la Haye du 5 octobre 1961)

1. País_____ARGENTINA_____
   El presente documento público
2. Ha sido firmado por RAQUEL COLOMER
3. Quien actúa en calidad de FUNCIONARIO HABILITANTE
4. Lleva el sello/timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE CAPITAL FEDERAL
5. En BUENOS AIRES 6. El día 29/07/2009
7. Por__UNIDAD DE COORDINACION LEGALIZACIONES__
   MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO
   INTERNACIONAL Y CULTO_____
8. Bajo el Número: 149647/2009
9. Sello/Timbre: 39

LA PRESENTE LEGALIZACION TIENE COMO UNICO EFECTO AUTENTICAR LA FIRMA Y CARACTER DEL OTORGANTE. SIN JUZGAR EL CONTENIDO DEL DOCUMENTO

10. Firma
Dn GUSTAVO EZEQUIEL SANTA ANA
Unidad de Coordinación Legalizaciones
Ministerio de Relaciones Exteriores
Comercio Internacional y Culto

Tipo de Documento: ACTUACION NOTARIAL
Titular del Documento: DANIEL GOYTIA

2009149647

1939917F6B9031883ED305C87367DFC8