

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 988 026**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00	(2006.01)
A61K 38/16	(2006.01)
A61P 3/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61K 38/22	(2006.01)
C07K 14/575	(2006.01)
C07K 14/72	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.08.2021 PCT/EP2021/072923**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **24.02.2022 WO22038179**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2021 E 21777954 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2024 EP 4199946**

54 Título: **Agonistas del receptor CRF2 y su uso en terapia**

30 Prioridad:

19.08.2020 EP 20315387

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

19.11.2024

73 Titular/es:

**SANOFI (100.0%)
46 Avenue de la Grande Armée
75017 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**ILLIANO, STEPHANE;
LUCATS, LAURENCE;
LEDEIN, LAETITIA;
BEAUVERGER, PHILIPPE;
JANIAK, PHILIP;
OZOUX, MARIE-LAURE;
HALLAND, NIS;
LI, ZIYU;
ELVERT, RALF;
EVERS, ANDREAS;
BIANCHI, ELISABETTA;
SANTOPRETE, ALESSIA;
ROVERSI, DANIELA y
TRIPEPI, MARTINA**

74 Agente/Representante:

DEL VALLE VALIENTE, Sonia

ES 2 988 026 T3

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

DESCRIPCIÓN

Agonistas del receptor CRF2 y su uso en terapia

5 **Campo**

La presente divulgación se refiere a compuestos que son agonistas del receptor 2 del factor liberador de corticotropina (CRF2, *corticotropin-releasing factor receptor 2*) y a su uso en terapia, especialmente en el tratamiento o la prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes.

10

Antecedentes

Las urocortinas (UCN) son péptidos endógenos que actúan a través de receptores del factor liberador de corticotropina (CRF), que son receptores acoplados a proteínas G (GPCR, *protein-coupled receptors*) de tipo 2. La familia de receptores CRF comprende receptores CRF1, que están codificados por el gen CRHR1, y receptores CRF2, que están codificados por el gen CRHR2.

15

20

En los mamíferos se conocen tres urocortinas endógenas: UCN1, UCN2 y UCN3. A pesar del alto grado de homología de secuencia, la unión de estos péptidos a CRF1 y CRF2 es diferente. CRF1 y CRF2 son activados de forma no selectiva por CRH y UCN1, mientras que UCN2 y UCN3 son agonistas selectivos de CRF2. En particular, UCN2 es un péptido de treinta y ocho aminoácidos que activa selectivamente el receptor CRF2, incluidas las isoformas conocidas CRF2-alfa (α), -beta (β) y -gamma (γ).

25

30

35

Las urocortinas y sus receptores participan en las respuestas neurohumorales a diversas situaciones patológicas y de estrés. En particular, las urocortinas provocan efectos hemodinámicos positivos tanto en modelos preclínicos como en pacientes con insuficiencia cardíaca o hipertensión. Las urocortinas y los receptores CRF se expresan en el corazón y en los vasos, expresando CRF2 altamente y CRF1 mínimamente (véase Waser y col., *Peptides*, 2006, 27, 3029-3038). En modelos experimentales, se ha demostrado que las urocortinas que actúan mediante la activación de CRF2 mejoran la función cardiovascular mediante el alivio de la resistencia vascular y mediante acciones inotrópicas y lusitrópicas cardíacas. En estudios clínicos, se ha demostrado que UCN2 y UCN3 tienen acciones vasodilatadoras directas en voluntarios sanos y en pacientes con insuficiencia cardíaca (véase Stirrat y col., *Br. J. Clin. Pharmacol.*, 2016, 82, 974-982), mientras que también se ha demostrado que UCN2 aumenta el gasto cardíaco y reduce la resistencia vascular en pacientes con insuficiencia cardíaca (véase Davis y col., *Eur. Heart J.*, 2007, 28, 2589-2597; y Chan y col., *JACC: Heart Failure*, 2013, 1, 433-441). Se ha demostrado que una sal acetato recombinante de UCN3 mejora el gasto cardíaco y reduce la resistencia vascular en un estudio multicéntrico de pacientes con insuficiencia cardíaca crónica estable (véase Gheorghide y col., *Eur. J. Heart Fail.*, 2013, 15, 679-89).

40

45

Estudios recientes han demostrado que la transferencia de genes UCN2 y/o UCN3 en ratones mejora no solo la función cardíaca sino también la eliminación de glucosa (véase Giamouridis y col., *JACC: Basic to Translational Science*, 2018, 3, 2). Además, se ha demostrado que la administración subcutánea de UCN2 pegilada mejora la tolerancia a la glucosa y aumenta la absorción de glucosa en el músculo esquelético, al tiempo que reduce el peso corporal mediante la limitación de la ingesta de alimentos (véase Borg y col., *Diabetes*, 2019, 1403-1414). Estos hallazgos sugieren que las urocortinas pueden ser útiles no solo en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares sino también en el tratamiento de enfermedades tales como la diabetes y la obesidad.

50

Sin embargo, la semivida extremadamente corta de las urocortinas sigue siendo una limitación importante para su uso terapéutico (véase Davies y col., *JACC*, 2007, 49, 461-471). Hasta la fecha, el tratamiento con urocortinas no puede mantenerse sin una perfusión intravenosa crónica. Sin embargo, el tratamiento de pacientes diabéticos crónicos o con insuficiencia cardíaca requiere un tratamiento adecuado para la autoadministración domiciliar y de larga duración.

55

En un intento de superar estas limitaciones, se han propuesto varios análogos de las urocortinas. Por ejemplo, el documento WO2018013803 (Alsina-Fernández; Eli Lilly and Company) divulga análogos de UCN2 que se cree que tienen utilidad en el tratamiento de enfermedades tales como la enfermedad renal crónica y la diabetes tipo II.

60

Sin embargo, sigue existiendo la necesidad de agonistas mejorados del receptor CRF2 que sean útiles como agentes terapéuticos, especialmente en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes. En particular, existe una necesidad de agonistas de CRF2 que tengan una eficacia, propiedades farmacocinéticas (por ejemplo, semivida mejorada) y/o propiedades fisicoquímicas (por ejemplo, estabilidad y/o solubilidad mejoradas) deseables.

Resumen

65

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona un compuesto que es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) (id. de sec. n.º 186): X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20-X21-X22-X23-X24-X25-X26-X27-X28-X29-X30-X31-X32-X33-X34-X35-X36-X37-X38 (I) en donde

ES 2 988 026 T3

- X1 es isoleucina (I) o fenilalanina (F);
- 5 X2 es valina (V) o treonina (T);
- X3 es leucina (L);
- X4 es serina (S);
- 10 X5 es leucina (L);
- X6 es aspartato (D);
- 15 X7 es valina (V) o D-valina (v);
- X8 es prolina (P);
- X9 es isoleucina (I) o treonina (T);
- 20 X10 es lisina (K), glutamato (E), histidina (H) o glicina (G);
- X11 es isoleucina (I) o leucina (L);
- 25 X12 es lisina (K), en donde el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina está unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina;
- X13 es glutamina (Q) o lisina (K);
- 30 X14 es isoleucina (I), lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
- X15 es leucina (L);
- X16 es leucina (L) o fenilalanina (F);
- 35 X17 es glutamato (E) o lisina (K);
- X18 es glutamina (Q);
- 40 X19 es alanina (A), glutamato (E) o glutamina (Q);
- X20 es lisina (K) o arginina (R);
- X21 es glutamina (Q) o lisina (K);
- 45 X22 es lisina (K), arginina (R) o glutamato (E);
- X23 es lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
- 50 X24 es glutamina (Q), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), leucina (L) o glutamato (E);
- X25 es arginina (R), lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
- X26 es alanina (A), glutamato (E), ácido 2-aminoisobutírico (Aib) o glutamina (Q);
- 55 X27 es glutamina (Q), ácido 2-aminoisobutírico (Aib) o lisina (K);
- X28 es alanina (A);
- 60 X29 es glutamato (E) o lisina (K);
- X30 es lisina (K) o treonina (T);
- X31 es asparagina (N) o alanina (A);
- 65 X32 es lisina (K), alanina (A), valina (V), treonina (T), glutamato (E) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);

X33 es arginina (R), lisina (K) o glutamina (Q);

X34 es isoleucina (I) o leucina (L);

5 X35 es leucina (L);

X36 es alanina (A) o glutamato (E);

10 X37 es glutamina (Q) o arginina (R); y

X38 es isoleucina (I) o valina (V);

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos, en donde la fracción de unión a albúmina es como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto

15 En un segundo aspecto de la divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de la divulgación y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.

20 Los compuestos y composiciones farmacéuticas divulgadas en la presente memoria son útiles en terapia y pueden usarse en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades mediante el agonismo del receptor CRF2. Así, en otros aspectos, la divulgación se refiere al uso de los compuestos y composiciones farmacéuticas en terapia, especialmente en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, sarcopenia, distrofia muscular, enfermedad renal, hipertensión pulmonar, enfermedad arterial periférica, inflamación, alergia e isquemia tisular; en particular en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares, incluyendo especialmente insuficiencia cardíaca, obesidad y diabetes.

Breve descripción de los dibujos

30 La Figura 1 es un gráfico que representa la ingesta de alimentos durante el período de administración de ratones C57BL/6N (DIO) alimentados con una dieta alta en grasas, tratados por vía subcutánea cada dos días con el compuesto de id. de sec. n.º 35 (círculos negros), un compuesto de referencia (círculos grises) o vehículo (círculos blancos). El eje x indica el día del estudio y el eje e indica la ingesta de alimentos (en gramos). Los valores se expresan como media \pm error estándar de la media (EEM).

35 La Figura 2 es un gráfico que representa el cambio de peso corporal relativo a lo largo del período de administración de ratones C57BL/6N (DIO) alimentados con una dieta alta en grasas, tratados por vía subcutánea con el compuesto de id. de sec. n.º 35 (círculos negros), un compuesto de referencia (círculos grises) o vehículo (círculos blancos). El eje x indica el día del estudio y el eje e indica el cambio relativo del peso corporal (en %). Los valores se expresan como media \pm EEM.

40 Figura 3: Secuencias representativas de péptidos según la invención con un perfil de estabilidad optimizado, en donde K[sema] representa $K[\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3]$

Descripción detallada

45 La presente divulgación se refiere a compuestos que son derivados de UCN2 y que son útiles como agonistas del receptor CRF2. Los compuestos presentan actividad y selectividad deseables en el receptor CRF2, en particular con respecto al receptor CRF1, así como propiedades farmacocinéticas mejoradas y efectos beneficiosos *in vivo* en modelos animales relevantes. Además, los compuestos presentan propiedades fisicoquímicas deseables, tales como solubilidad y estabilidad deseables, lo que los convierte en excelentes candidatos para formulaciones en solución para administración subcutánea. Los compuestos son útiles en terapia, especialmente en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares, obesidad, diabetes, sarcopenia, distrofia muscular, enfermedad renal, hipertensión pulmonar, enfermedad arterial periférica, inflamación, alergia e isquemia tisular; en particular en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares, incluyendo especialmente insuficiencia cardíaca, obesidad y diabetes.

55 Compuestos

Los compuestos de la divulgación son péptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) citada anteriormente o sales farmacéuticamente aceptables de dichos péptidos.

60 En la presente divulgación, se hace referencia a los aminoácidos por su nombre, sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. También se pueden utilizar códigos de tres letras generalmente aceptados para otros aminoácidos, tales como Aib para el ácido 2-aminoisobutírico. A menos que se indique lo contrario, todos los aminoácidos empleados en los compuestos de la divulgación son L-aminoácidos. Así, por ejemplo, a la L-valina se le denomina "valina", "V" o "Val", mientras que la D-valina se identifica específicamente como tal.

65

Los compuestos de la invención se exponen en el conjunto de reivindicaciones adjunto y comprenden un residuo de lisina (K) modificado en la posición indicada por X12 en la Fórmula (I), en donde una fracción de unión a albúmina como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto está unido covalentemente al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina.

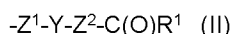
La expresión “fracción de unión a albúmina”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una fracción tal como se define en el conjunto de reivindicaciones adjunto que es capaz de unirse a la albúmina mediante unión covalente.

En una realización particular, la fracción de unión a albúmina comprende un grupo de ácido graso C14-C24 que está conjugado con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina mediante un enlace directo o mediante un conector. La expresión “ácido graso C14-C24”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa un ácido carboxílico que tiene de 14 a 24 átomos de carbono. El ácido graso C14-C24 puede ser un monoácido saturado o un diácido saturado. Por “saturado” se entiende que el ácido graso no contiene enlaces dobles o triples carbono-carbono.

Ejemplos de ácidos grasos saturados C14-C24 incluyen ácido mirístico (ácido tetradecanoico; un monoácido C14), ácido tetradecanodioico (un diácido C14), ácido pentadecílico (ácido pentadecanoico; un monoácido C15), ácido pentadecanoico (un diácido C15), ácido palmítico (ácido hexadecanoico; un monoácido C16), ácido hexadecanodioico (un diácido C16), ácido margárico (ácido heptadecanoico; un monoácido C17), ácido heptadecanodioico (un diácido C17), ácido esteárico (ácido octadecanoico; un monoácido C18), ácido octadecanodioico (un diácido C18), ácido nonadecílico (ácido nonadecanoico; un monoácido C19), ácido nonadecanodioico (un diácido C19), ácido aracadico (ácido eicosanoico; un monoácido C20), ácido eicosanodioico (un diácido C20), ácido heneicosílico (ácido heneicosanoico; un monoácido C21), ácido heneicosanodioico (un diácido C21), ácido behénico (ácido docosanoico; un monoácido C22), ácido docosanodioico (un diácido C22), ácido lignocérico (ácido tetracosanoico; un monoácido C24), ácido tricosanoico (un monoácido C23), ácido tricosanoico (un diácido C23) y ácido tetracosanodioico (un diácido C24). En una realización, el grupo de ácidos grasos C14-C24 se selecciona del grupo que consiste en ácido palmítico (ácido hexadecanoico; un monoácido C16), ácido hexadecanodioico (un diácido C16), ácido esteárico (ácido octadecanoico; un monoácido C18), ácido octadecanodioico (un diácido C18), ácido aracadico (ácido eicosanoico; un monoácido C20) y ácido eicosanodioico (un diácido C20).

El ácido graso C14-C24 puede estar unido directamente al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina. Como alternativa, el ácido graso C14-C24 puede unirse al grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina a través de un conector. El conector puede comprender uno o más grupos seleccionados de [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo (denominado en la presente memoria “AEEA”), glicina (Gly), N-metilglicina (N-MeGly), ácido 3-[2-[2-[2-(2-aminoetoxi)etoxi]-etoxi]-etoxi]-propiónico (N.º CAS 663921-15-1, también conocido como ácido amino-PEG4 o ácido (PEO)4-aminopropiónico), ácido amino-PEG6 (N.º CAS 905954-28-1), ácido amino-PEG8 (N.º CAS 756526-04-2) y gamma-glutamato (gGlu); en particular seleccionados de AEEA, Gly, N-MeGly y gGlu; más en particular seleccionados de AEEA, y gGlu.

La fracción de unión a albúmina es un grupo de Fórmula (II):



en donde,

Y es AEEA, {AEEA}₂, {AEEA}_s, Gly, {Gly}₂, {Gly}₃, N-MeGly, {N-MeGly}₂, {N-MeGly}₃ o está ausente; cuando Z2 es gGlu, o {gGlu}₂, en donde AEEA significa [2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilo;

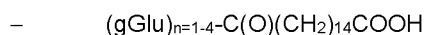
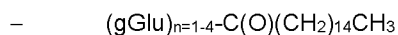
Z¹ y Z² cada uno de ellos se selecciona independientemente de gGlu, {gGlu}₂, {gGlu}₃, {gGlu}₄ o está ausente; donde Z¹ está ausente cuando Y es {AEEA}₂ y Z² es gGlu o {gGlu}₂; y

R¹ es -(CH₂)_xCOOH o -(CH₂)_xCH₃; en particular -(CH₂)_xCOOH en donde x es un número entero de 12 a 22.

Sorprendentemente se ha descubierto, y como se desprende de los ejemplos siguientes en la presente memoria, que las fracciones de unión a albúmina que comprenden un ácido carboxílico libre tienen una selectividad por CRF2 mejorada. Por lo tanto, en una realización particular, R¹ es -(CH₂)_xCOOH, en donde x es 14, 16 o 18; en particular 16 o 18; más en particular 14 o 16; aún más en particular 14.

En una realización, R¹ es -(CH₂)_xCH₃, en donde x es 14, 16 o 18; en particular 14 y 16.

En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:



- (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆CH₃
- 5 – (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
- (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈CH₃
- (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH
- 10 – (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄CH₃
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
- 15 – (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆CH₃
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈CH₃
- 20 – (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄CH₃
- 25 – (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆CH₃
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
- 30 – (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈CH₃
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH

En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

- 35 – (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
- (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
- 40 – (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
- 45 – (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
- 50 – (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH

En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

- 55 – {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₈COOH;
- 60 – {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₈COOH;
- C(O)(CH₂)₁₆COOH;

- gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- 5 – gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃;
- gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- 10 – {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y
- {AEEA}₂-{gGlu}₁₂-C(O)(CH₂)₁₄CH₃.

15 En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- 20 – {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₈COOH;
- {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₈COOH;
- 25 – C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- 30 – gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y
- {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄COOH.

35 En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

- (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- 40 – (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- 45 – (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y
- (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH.

50 En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- 55 – {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- 60 – C(O)(CH₂)₁₆COOH;
- C(O)(CH₂)₁₄COOH;
- gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

– gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH.

En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

5

– (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH;

– (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y

10

– (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH.

En una realización, la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:

15

– {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH;

– {AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄COOH;

– C(O)(CH₂)₁₄COOH; y

20

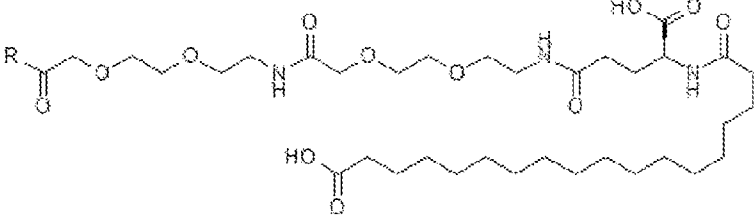
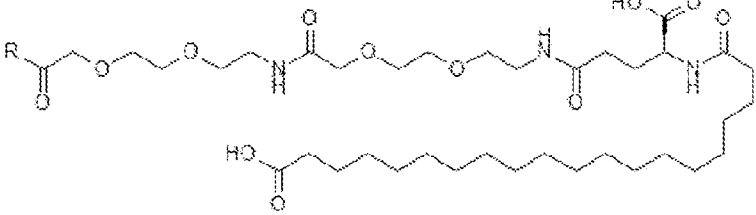
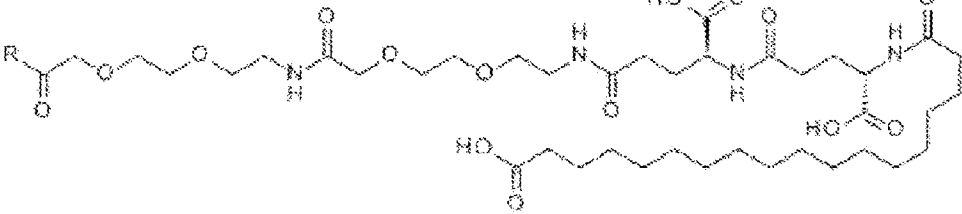
– gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH.

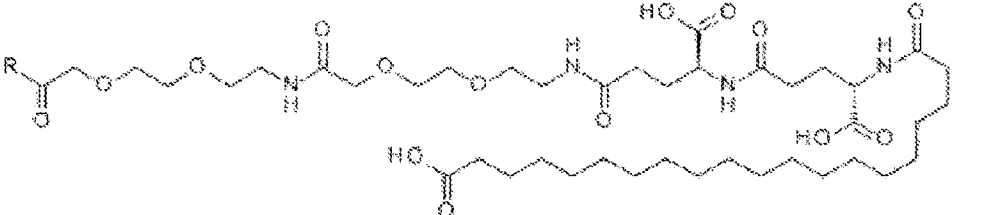
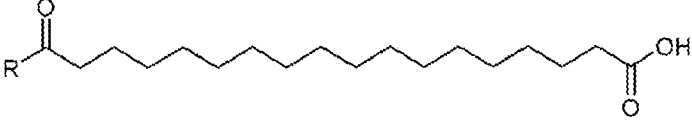
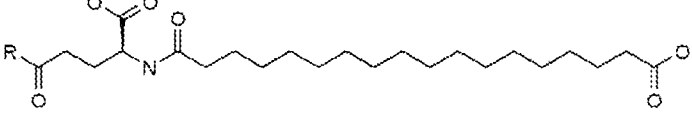

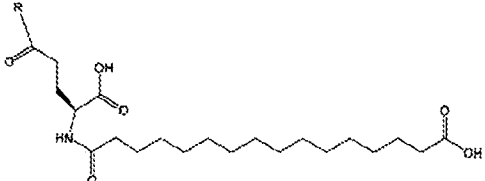
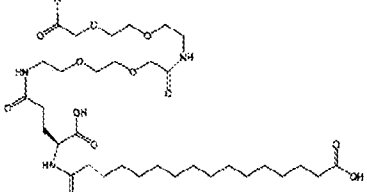
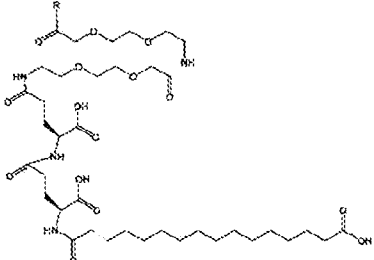
En una realización, la fracción de unión a albúmina es -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; o -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH.

25

Las estructuras químicas y los nombres IUPAC de estos grupos se muestran en la Tabla 1 a continuación, en donde R denota el punto de unión de cada grupo al grupo épsilon-amino del residuo de lisina en X12:

Tabla 1

Grupo	Estructura química y nombre IUPAC
-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH	 <p data-bbox="430 1355 1436 1411">[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-</p>
-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH	 <p data-bbox="430 1657 1436 1713">[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]etoxi]etoxi]-acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-</p>
-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH	 <p data-bbox="430 1960 1436 2016">[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[(4S)-4-carboxi-4-[[[(4S)-4-carboxi-4-(17-carboxiheptadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil]-</p>

Grupo	Estructura química y nombre IUPAC
<p>-{AEEA}₂-{gGlu}₂- C(O)(CH₂)₁₈COOH</p>	 <p>[2-[2-[2-[[2-[2-[2-[[[4S]-4-carboxi-4-[[[4S]-4-carboxi-4-(19-carboxinonadecanoilamino)butanoil]amino]butanoil]amino]etoxi]-etoxi]acetil]amino]etoxi]etoxi]acetil-</p>
<p>-C(O)(CH₂)₁₆COOH</p>	 <p>ácido 18-oxooctadecanoico</p>
<p>-gGlu- C(O)(CH₂)₁₆COOH</p>	 <p>ácido 18-[[[1S]-1-carboxi-4-oxo-butil]amino]-18-oxo-octadecanoico</p>
<p>-gGlu- C(O)(CH₂)₁₄CH₃</p>	 <p>ácido (2S)-2-(hexadecanoilamino)-5-oxo-pentanoico</p>
<p>-gGlu- C(O)(CH₂)₁₄COOH</p>	
<p>-{AEEA}₂-gGlu- C(O)(CH₂)₁₄COOH</p>	
<p>-{AEEA}₂-{gGlu}₂- C(O)(CH₂)₁₄COOH</p>	

Grupo	Estructura química y nombre IUPAC
$\text{-}\{AEEA\}_2\text{-gGlu-}$ $\text{C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$	
$\text{-}\{AEEA\}_2\text{-}\{gGlu\}_2\text{-}$ $\text{C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$	

En una realización particular, la fracción de unión a albúmina es $\text{-}\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$; $\text{-}\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$; o $\text{-}\{AEEA\}_2\text{-}\{gGlu\}_2\text{-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$. En una realización más particular, la fracción de unión a albúmina es $\text{-}\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$.

5 En una realización, el compuesto es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las id. de sec. n.º 1 a 227 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

10 En una realización, el compuesto es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las id. de sec. n.º 3, 7, 35, 83, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 147, 149, 151, 152, 171, 172, 173 y 174 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra realización, el compuesto es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las id. de sec. n.º 35, 130, 135, 137, 140, 142, 149, 151 y 152. En una realización, el compuesto es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las id. de sec. n.º 35, 130, 83, 135, 136, 137, 138, 139, 147, 151, 174. En una realización más adicional, el compuesto es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las id. de sec. n.º 35, 130, 135, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 149, 151 y 152 o una sal farmacéuticamente aceptable. del mismo.

20 En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I), opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:

25 X1 es isoleucina (I);

X2 es valina (V);

X7 es valina (V) o D-valina (v)

30 X9 es isoleucina (I) o treonina (T); en particular isoleucina (I);

X10 es lisina (K) o glicina (G);

35 X11 es leucina (L);

X13 es lisina (K) o glutamina (Q);

X14 es lisina (K) o isoleucina (I); en particular isoleucina (I)

40 X16 es leucina (L);

X19 es alanina (A) o glutamato (E);

45 X21 es glutamina (Q);

- X22 es glutamato (E) o arginina (R) o lisina (K); en particular arginina (R) o lisina (K); más en particular lisina (K);
- 5 X23 es lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib); en particular lisina (K)
- X24 es glutamato (E) o glutamina (Q) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib); en particular glutamina (Q) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
- 10 X25 es lisina (K) o arginina (R); en particular arginina (R);
- X26 es alanina (A), glutamato (E) o glutamina (Q); en particular glutamato (E) o glutamina (Q);
- X27 es lisina (K) o glutamina (Q); en particular lisina (K) o glutamina (Q); más en particular glutamina (Q);
- 15 X29 es glutamato (E);
- X30 es lisina (K) o treonina (T); en particular lisina (K);
- 20 X31 es asparagina (N);
- X32 es lisina (K) o alanina (A); en particular lisina (K)
- X33 es arginina (R) o glutamina (Q)
- 25 X34 es isoleucina (I);
- X35 es leucina (L);
- 30 X36 es alanina (A) o glutamato (E); en particular glutamato (E);
- X37 es arginina (R) o glutamina (Q); en particular glutamina (Q); y
- X38 es valina (V);
- 35 y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado.
- En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:
- 40 X1 es isoleucina (I);
- X2 es valina (V);
- 45 X7 es D-valina (v);
- X9 es isoleucina (I);
- 50 X10 es lisina (K) o glicina (G);
- X11 es leucina (L);
- X13 es glutamina (Q);
- 55 X14 es isoleucina (I);
- X16 es leucina (L);
- 60 X19 es alanina (A) o glutamato (E);
- X21 es glutamina (Q);
- X22 es lisina (K);
- 65 X23 es lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib)

X24 es glutamina (Q) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);

X25 es arginina (R);

5 X26 es glutamato (E) o glutamina (Q) o alanina (A);

X27 es lisina (K) o glutamina (Q); en particular glutamina (Q)

X29 es glutamato (E);

10

X30 es lisina (K) o treonina (T);

X31 es asparagina (N);

15

X32 es lisina (K);

X33 es arginina (R) o glutamina (Q);

X34 es isoleucina (I);

20

X35 es leucina (L);

X36 es glutamato (E) o alanina (A);

25

X37 es glutamina (Q) o arginina (R);

X38 es valina (V);

30

y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado.

En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:

35

X1 es isoleucina (I);

X2 es valina (V);

X9 es isoleucina (I);

40

X10 es lisina (K);

X11 es leucina (L);

45

X14 es isoleucina (I);

X16 es leucina (L);

X19 es glutamato (E);

50

X21 es glutamina (Q);

X22 es lisina (K);

55

X24 es glutamina (Q);

X25 es arginina (R);

X26 es glutamato (E);

60

X27 es glutamina (Q);

X29 es glutamato (E);

65

X31 es asparagina (N);

X32 es lisina (K);

X33 es glutamina (Q);

5 X34 es isoleucina (I);

X35 es leucina (L);

10 X37 es glutamina (Q); y

X38 es valina (V);

y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado.

15 En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:

20 X7 es D-valina (V);

X10 es lisina;

X19 es glutamato (E);

25 X24 es glutamina (Q);

X25 es arginina (R);

30 X26 es glutamato (E);

X27 es glutamina (Q).

X30 es lisina (K);

35 X33 es glutamina (Q);

X36 es alanina (A);

40 X37 es glutamina (Q);

y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado.

45 En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado como una amida primaria.

50 En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:

X1 es isoleucina (I);

X2 es valina (V);

55 X9 es isoleucina (I);

X10 es lisina (K) o glicina (G);

X11 es leucina (L);

60 X14 es isoleucina (I);

X16 es leucina (L);

65 X19 es alanina (A) o glutamato (E);

X21 es glutamina (Q);

X22 es lisina (K);

5 X24 es glutamina (Q) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);

X25 es arginina (R);

X26 es alanina (A), glutamato (E) o glutamina (Q);

10

X27 es glutamina (Q);

X29 es glutamato (E);

15 X31 es asparagina (N);

X32 es lisina (K);

X33 es arginina (R) o glutamina (Q);

20

X34 es isoleucina (I);

X35 es leucina (L); y

25 X38 es valina (V);

y en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado como una amida primaria.

En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:

30

X1 es isoleucina (I);

X2 es valina (V);

35

X9 es isoleucina (I);

X10 es lisina (K), glutamato (E) o glicina (G);

40 X11 es leucina (L);

X14 es isoleucina (I);

X15 es leucina (L)

45

X16 es leucina (L);

X19 es alanina (A) o glutamato (E); en particular glutamato (E);

50 X21 es glutamina (Q);

X22 es lisina (K) o glutamato (E);

X23 es ácido 2-aminoisobutírico (Aib);

55

X24 es glutamina (Q);

X25 es arginina (R);

60 X26 es glutamato (E);

X27 es glutamina (Q);

X29 es glutamato (E);

65

X31 es asparagina (N);

X32 es lisina (K) o glutamato (E); en particular glutamato (E);

5 X33 es glutamina (Q);

X34 es isoleucina (I);

X35 es leucina (L); y

10 X38 es valina (V);

y en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y el residuo de aminoácido en X38 está amidado como una amida primaria.

15 En una realización, el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde:

X1 es isoleucina (I);

20 X2 es valina (V);

X9 es isoleucina (I);

25 X10 es lisina (K);

X11 es leucina (L);

X14 es isoleucina (I);

30 X16 es leucina (L);

X19 es glutamato (E);

35 X21 es glutamina (Q);

X22 es lisina (K);

X24 es glutamina (Q);

40 X25 es arginina (R);

X26 es glutamato (E);

45 X27 es glutamina (Q);

X29 es glutamato (E);

X31 es asparagina (N);

50 X32 es lisina (K);

X33 es glutamina (Q);

55 X34 es isoleucina (I);

X35 es leucina (L);

X37 es glutamina (Q); y

60 X38 es valina (V);

y en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado como una amida primaria.

65 En una realización, el compuesto es un péptido de una cualquiera de las id. de sec. n.º 1 a 227 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. Estos péptidos se enumeran en la Tabla 2 a continuación, donde K* indica

el residuo de lisina modificado en X12, R^a indica la fracción de unión a albúmina, Ac- indica que el N-terminal está acetilado y -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria:

Tabla 2

5

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	R ^a
1	IVLSLDVPIGLK*QILLEQEKEKEKQQAETNAQILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
2	IVLSLDVPIKIK*KILLEQEKEKEKQQAETNAQILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
3	IVLSLDVPIKIK*KILLEQEKEKEKQQAETNAQILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
4	IVLSLDVPIGLK*QKLLKQEKEKEKQQAETNAKILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
5	IVLSLDVPIGLK*QKLLKQQRQRKERQQAETNARILARV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
6	IVLSLDVPIGLK*QKLLKQQRQRKERQQAETNARILARV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
7	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEREQAETNARILARV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
8	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAAQILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
9	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAKQILEQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
10	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAKQILEQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
11	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAAQILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
12	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAAKILARV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
13	FTLSLDVPTKIK*QILFKQKQKKERQQAETNAKQLEQI-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
14	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAAKILARV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
15	FTLSLDVPTKIK*QKLFKQAKQKQRQKAKTAAQILARV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
16	IVLSLDVPIGLK*QKLLKQQRQRKERQQAETNARILARV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
17	IVLSLDVPIKIK*KILLEQEKKQRQQAETNAQILAQV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
18	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
19	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRAibEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
20	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKAibEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
21	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEAibEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
22	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKAibQRQKAETNAQILAQV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
23	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKERAibQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
24	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
25	IVLSLDvPTKIK*KKLLKQERKRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
26	IVLSLDvPTKIK*KKLLKQERKRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
27	IVLSLDvPTKIK*KKLLKQERKRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
28	IVLSLDvPTKIK*KKLLKQERKRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
29	IVLSLDvPTKIK*KKLLKQERKRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
30	IVLSLDvPTKIK*KKLLKQERKRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
31	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
32	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
33	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKEREQAETNAKILERV-NH ₂	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
34	FTLSLDVPTKIK*QKLLKQEKKQRQKAKTAAKQILEQV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
35	IVLSLDVPIKIK*KILLEQEKKQRQQAETNAQILAQV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
36	IVLSLDvPTKIK*QKLLKQERQRKAibEREQAETNAKILERV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
37	IVLSLDVPTKIK*QKLLKQERQRKERQQAETNAKILERV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
38	IVLSLDVPTKIK*QKLLKQERQRAibEREQAETNAKILERV-NH ₂	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	R ^a
39	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQRKERQQAETNAQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
40	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQRKERQQAETNVQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
41	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQRKERQQAENVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
42	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQRAibERQQAENVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
43	IVLSLDVPIKIK*QILLEQAKQKKLRAQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
44	IVLSLDVPIKIK*QILLEQAKQKKERAQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
45	IVLSLDVPIKIK*QILLEQAKQKAibLKAQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
46	IVLSLDVPIKIK*QILLEQAKQKAibLRAQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
47	IVLSLDVPTKIK*KKLLKQERKRAibEREKAEKAARILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
48	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQRAibERQQAETNVQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
49	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQRAibERQQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
50	IVLSLDVPTKIK*QILLKQERQRAibERQQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
51	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAENKQLLEQI-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
52	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAENKQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
53	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAETNKQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
54	FTLSLDVPIKIK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
55	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
56	FTLSLDVPIGLK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
57	FTLSLDVPIGLK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
58	FTLSLDVPTKIK*QILFKQKQKKKERQQAENKQLLEQI-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
59	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAENKQLLEQI-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
60	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAENKQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
61	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAETNKQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
62	FTLSLDVPIKIK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
63	FTLSLDVPIKIK*QILLEQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
64	FTLSLDVPTKIK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
65	FTLSLDVPIGLK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
66	FTLSLDVPIGLK*QILLKQKQKKKERQQAETNVQLLERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
67	IVLSLDVPIKIK*QILLEQEKQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
68	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
69	IVLSLDVPIKIK*KaibLLEQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
70	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
71	IVLSLDVPIKIK*KaibLLEQERQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
72	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKKQRQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
73	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKKQRQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
74	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKKQREQAETNAibQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
75	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQRQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
76	IVLSLDVPIGLK*QILLEQERQKKQRQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
77	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
78	IVLSLDVPTKIK*QILLEQERQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
79	IVLSLDVPIKIK*QILLEQEKQKAibQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	R ^a
80	IVLSLDVPTKPK*QILLEQERQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
81	IVLSLDVPIKPK*QILLEQEKKQKAibQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
82	IVLSLDVPTKPK*QILLKQERQKKQREQAETNVRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
83	IVLSLDVPIGLK*QILLKQERQKKQREQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
84	IVLSLDVPIKPK*QKLLQEKKQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
85	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
86	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
87	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREKAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
88	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREKAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
89	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
90	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREKAETNVQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
91	IVLSLDVPIKPK*QKLLKQERQKKQREKAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
92	IVLSLDVPIKPK*QKLLQEKKQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
93	IVLSLDVPIKPK*QKLLKQERQKKQREKAETNVQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
94	IVLSLDVPIKPK*KILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
95	IVLSLDVPIKPK*QKLLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
96	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
97	IVLSLDVPIKPK*QKLLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
98	IVLSLDVPIKPK*QKLLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
99	IVLSLDVPIKPK*KILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
100	IVLSLDVPIKPK*KILLKQERQKKQREQAETNAibQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
101	IVLSLDVPIKPK*KILLKQERQKKQREQAETNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
102	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
103	IVLSLDVPIKPK*QILLEQERQKAibQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
104	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
105	IVLSLDVPIKPK*QILLEQERQKAibQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
106	IVLSLDVPIKPK*QILLEQERQKAibQREQAETNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
107	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAETNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
108	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
109	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQREKAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
110	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
111	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
112	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREKAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
113	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
114	IVLSLDVPIKPK*QILLEQARQKAibQRAQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
115	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAETNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
116	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQREKAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
117	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
118	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKAibQRQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
119	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
120	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKQREQAETNKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	R ^a
121	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQREKAEKNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
122	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
123	IVLSLDVPIKIK*QILLEQARQKAibQRAQAEKNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
124	IVLSLDVPIKIK*QILLKQARQKAibQRAQAEKNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
125	IVLSLDVPIKIK*QILLEQARQKAibQREQAENKKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
126	IVLSLDVPIKIK*QILLEQAKQKAibQRAQAEKNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
127	IVLSLDVPIKIK*QILLEQAKQKAibQREQAENKKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
128	IVLSLDVPIKIK*QILLKQARQKAibQREQAENKKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
129	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
130	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
131	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKAibQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
132	IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
133	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
134	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKAibQREKAEKNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
135	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKAibQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
136	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKAibRQKAEKNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
137	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
138	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQREKAEKNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
139	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
140	IVLSLDVPIKIK*QILLEQARQKAibQRAQAEKNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
141	IVLSLDVPIKIK*QILLKQARQKAibQRAQAEKNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
142	IVLSLDVPIKIK*QILLEQARQKAibQREQAENKKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
143	FTLSLDVPTKIK*QILLKQEKKQKQRQKAKTNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
144	FTLSLDVPTKIK*QILLKQERQKKQRQKAKTNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
145	FTLSLDVPTKIK*QILLKQERQKKQRQKAKKNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
146	FTLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKQRQKAKKNKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
147	IVLSLDVPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
148	IVLSLDVPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
149	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
150	IVLSLDVPIGLK*QILLKQERQKKAibRQQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
151	IVLSLDVPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAENKKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
152	IVLSLDVPIKIK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
153	Ac-IVLSLDVPIGLK*QILLEQEKKQEKEKQQAETNAQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
154	IVLSLDVPIGLK*QILLEQEKKQEKEKQQAETNKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
155	IVLSLDVPIGLK*QILLEQEKKQEKEKQQAENKKRILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
156	IVLSLDVPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNAQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
157	Ac-IVLSLDVPIKIK*QILLEQARQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
158	Ac-IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
159	Ac-IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQEAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
160	Ac-IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQEAibEREQAETNKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
161	Ac-IVLSLDVPIKIK*QILLEQERQEAibEREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	R ^a
162	Ac-IVLSLDvPIELK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
163	Ac-IVLSLDvPIHLK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
164	Ac-IVLSLDvPIGLK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
165	Ac-IVLSLDvPIKPK*QILLEQARQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
166	Ac-IVLSLDvPIKPK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
167	Ac-IVLSLDvPIGLK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
168	Ac-IVLSLDvPIELK*QILLEQERQKAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
169	Ac-IVLSLDvPIKPK*QILLEQERQEAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
170	Ac-IVLSLDvPIELK*QILLEQERQEAibQREQAENKQILEQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
171	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
172	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
173	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
174	IVLSLDvPIKPK*QILLKQARQKAibQRAQAENKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
175	IVLSLDvPIKPK*QILLKQARQKAibQRAQAENKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
176	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
177	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
178	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
179	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
180	IVLSLDvPIKPK*QILLKQARQKAibQRAQAENKQILERV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
181	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
182	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKAibQREQAENKQILAQV-NH2	-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
183	IVLSLDvPIKPK*QILLKQARQKAibQRAQAENKQILERV-NH2	-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
184	IVLSLDvPIKPK*QILLKQERQKKQRQQAENKQILAQV-NH2	-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
185	IVLSLDVPIKPK*QILLKQERQKKAibRQKAETNKQILAQV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₆ COOH
223	IVLSLDvPTKPK*QKLLKQERQRKEREQAENKQILERV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
224	IVLSLDvPTKPK*KKLLKQERKRAibEREKAENKQILERV-NH2	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₈ COOH
225	IVLSLDvPTKPK*QKLLKQERQRKEREaibAEKNKQILERV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
226	IVLSLDvPIGLK*QKLLKQQRQRKERQQAENKQILERV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
227	IVLSLDvPIKPK*QKLLKQQRQRKERQQAENKQILERV-NH2	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 7):

IVLSLDvPTKPK*QKLLKQERQRKEREQAENKQILERV-NH2 en donde

5 el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y

10 -NH2 indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 32):

15 IVLSLDvPTKPK*QKLLKQERQRKEREQAENKQILERV-NH2 en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y

5 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 35):

10 IVLSLDVPIK***L**K***K**ILLEQE**K**Q**K**Q**K**Q**R**E**Q**A**E**T**N**K**Q**I**L**A**Q**V-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

15 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 83):

IVLSLDvPIGLK***Q**ILL**K**Q**R**Q**K**A**i**b**R**E**Q**A**E**T**N**K**R**I**L**E**R**V-NH₂ en donde

25 el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 130):

35 IVLSLDvPIK***Q**ILL**K**Q**R**Q**K**A**i**b**Q**R**E**Q**A**E**K**N**K**Q**I**L**A**Q**V**-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -{AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; - {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y -{AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; en particular -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
45 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 135):

IVLSLDvPIK***Q**ILL**K**Q**R**Q**K**A**i**b**Q**R**Q**Q**A**E**K**N**K**Q**I**L**A**Q**V**-NH₂ en donde

50 el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; en particular -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 136):

60 IVLSLDvPIK***Q**ILL**K**Q**R**Q**K**A**i**b**R**Q**K**A**E**K**N**K**Q**I**L**A**Q**V-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -{AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; - {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y -{AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y

65 - {AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y -{AEEA}₂-{gGlu}₂-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y

ES 2 988 026 T3

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

5 En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 137):

IVLSLDvPIK^{*}LK*QILLKQERQKKQREQAENKQILEQV-NH₂ en donde

10 el residuo K en la posición 12 (indicado como K^{*}) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; en particular -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

15 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 138):

20 IVLSLDvPIK^{*}LK*QILLKQERQKKQREQAENKQILEQV-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K^{*}) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y

25 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

30 En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 139):

IVLSLDvPIK^{*}LK*QILLKQERQKKQRQAENKQILAQV-NH₂ en donde

35 el residuo K en la posición 12 (indicado como K^{*}) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y

40 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 140):

45 IVLSLDvPIK^{*}LK*QILLEQARQKAibQRAQAENKRLERV-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K^{*}) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

50 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 141):

55 IVLSLDvPIK^{*}LK*QILLKQARQKAibQRAQAENKRLERV-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K^{*}) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH; y

60 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;
o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 142):

65 IVLSLDvPIK^{*}LK*QILLEQARQKAibQREQAENKRLERV-NH₂ en donde

ES 2 988 026 T3

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$; y

5 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 147):

10

IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH₂ en donde

15 el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre $-\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$; $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$; $-\{AEEA\}_2\text{-[gGlu]}_2\text{-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$; $-\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$; $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$; y $-\{AEEA\}_2\text{-[gGlu]}_2\text{-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$ y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 149):

IVLSLDvPIKLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH₂ en donde

25 el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;

30 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 150):

35 IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibRQQAETNKRILERV-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre $-\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$; y $-\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$; y

40 -NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 151):

45

IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH₂ e donde

50 el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre $\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$; $-\text{gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$ y $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$; en particular $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;

55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 152):

60 IVLSLDVPIKLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de modo que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a $-\{AEEA\}_2\text{-gGlu-C(O)(CH}_2\text{)}_{16}\text{COOH}$; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria;

65

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización, el compuesto es un péptido de la siguiente secuencia de aminoácidos (id. de sec. n.º 174):

IVLSLDvPIK*KLK*QILLKQARQKAibQRAQAENKRLERV-NH₂ en donde

el residuo K en la posición 12 (indicado como K*) se modifica químicamente de manera que el grupo épsilon-amino de su cadena lateral esté unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina seleccionada entre -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH; y -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃; y

-NH₂ indica que el residuo de aminoácido C-terminal está amidado como una amida primaria; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Los compuestos de la divulgación se pueden preparar y utilizar en forma de sales farmacéuticamente aceptables. Las sales farmacéuticamente aceptables y los métodos para su preparación son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Stahl, y col. "Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use", Segunda edición revisada, Wiley-VCH, 2011; y Berge, y col., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Sciences, 1977, 66, 1). Ejemplos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales trifluoroacetato, sales acetato y sales clorhidrato.

Síntesis de compuestos

Se pueden usar una variedad de métodos para preparar los compuestos de la divulgación. Los compuestos pueden prepararse por síntesis en solución o sobre un soporte sólido, con posterior aislamiento y purificación. Como alternativa, los péptidos pueden prepararse mediante expresión génica en una célula hospedadora en donde se ha introducido una secuencia de ADN que codifica el péptido. La expresión génica también se puede lograr sin utilizar un sistema celular. También se pueden utilizar combinaciones de métodos.

En particular, los compuestos pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida sobre una resina adecuada. La síntesis de péptidos en fase sólida es una metodología bien establecida (véase, por ejemplo, Stewart y Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., 1984; y Atherton and Sheppard, "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach", Oxford-IRL Press, Nueva York, 1989).

Se pueden utilizar procedimientos de síntesis en fase sólida manuales o automatizados convencionales para preparar los compuestos. Los sintetizadores de péptidos automatizados están comercializados, por ejemplo, por Applied Biosystems (Foster City, CA) y Protein Technologies Inc. (Tucson, AZ). Los reactivos para la síntesis en fase sólida están fácilmente disponibles en fuentes comerciales. Los sintetizadores en fase sólida se pueden utilizar según las instrucciones del fabricante para bloquear grupos de interferencia, proteger los aminoácidos durante la reacción, acoplar, desproteger y bloquear los aminoácidos que no han reaccionado.

La síntesis en fase sólida puede iniciarse uniendo un aminoácido protegido N-terminalmente con su extremo carboxi a un soporte sólido inerte que lleva un conector escindible. El soporte sólido puede ser cualquier polímero que permita el acoplamiento del aminoácido inicial, por ejemplo, una resina de tritilo, una resina de clorotritilo, una resina Wang o una resina Rink en donde el enlace del grupo carboxi (o grupo carboxamida para una resina Rink) a la resina es sensible al ácido (cuando se usa una estrategia Fmoc). El soporte debe ser estable en las condiciones utilizadas para desproteger el grupo α-amino durante la síntesis del péptido.

Después de acoplar el primer aminoácido protegido N-terminalmente al soporte sólido, se elimina el grupo protector α-amino de este aminoácido usando un reactivo como por ejemplo ácido trifluoroacético (TFA) o piperidina. Los aminoácidos protegidos restantes se acoplan luego uno tras otro o se añaden como un dipéptido, tripéptido o tetrapéptido preformado en el orden representado por la secuencia peptídica usando reactivos de acoplamiento de amida apropiados. Ejemplos de reactivos de acoplamiento incluyen hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris(dimetilamino)fosfonio (BOP), hexafluorofosfato de benzotriazol tetrametil uronio (HBTU), hexafluorofosfato de azabenzotriazol tetrametil uronio (HATU), diisopropil-carbodiimida (DIC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBT) y 1-hidroxibenzotriazol y combinaciones de los mismos. Normalmente, los acoplamientos se realizan a temperatura ambiente en un disolvente inerte tal como dimetilformamida (DMF), N-metilpirrolidona (NMP) o diclorometano (DCM).

Habitualmente, los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos se protegen con grupos bloqueantes adecuados. Estos grupos protectores se eliminan después de que se hayan ensamblado los péptidos deseados y pueden eliminarse simultáneamente con la escisión del producto deseado de la resina en las mismas condiciones. Los grupos protectores y los procedimientos para su introducción son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Greene y Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3ª ed., 1999, Wiley & Sons). Ejemplos de grupos protectores incluyen terc-butiloxicarbonilo (tBoc) y fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc).

La fracción de unión a albúmina puede introducirse funcionalizando selectivamente el residuo de lisina (K) en la posición indicada por X12. Por tanto, el residuo de lisina puede comprender un grupo protector de cadena lateral que puede eliminarse selectivamente mientras que otros grupos protectores de cadena lateral permanecen intactos, de

modo que el residuo de lisina desprotegido puede funcionalizarse selectivamente mediante la fracción de unión a albúmina. La conjugación de la fracción de unión a albúmina con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina se puede lograr mediante una reacción de acilación u otras reacciones adecuadas conocidas en la técnica.

5 A modo de ilustración, el residuo de lisina puede protegerse con un grupo protector 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohex-1-iliden)-3-metilbutilo ("ivDde"), que es lábil a bases altamente nucleófilas, tales como hidrazina al 4 % en DMF (véase Chhabra y col., Tetrahedron Lett. 1998, 39, 1603). Por lo tanto, si el grupo amino N-terminal y todas las funcionalidades de la cadena lateral están protegidos con grupos protectores lábiles a los ácidos, el grupo ivDde puede eliminarse selectivamente usando una base altamente nucleófila. El grupo amino libre resultante puede conjugarse luego con la fracción de unión a albúmina, por ejemplo, mediante acilación. Como alternativa, el residuo de lisina puede protegerse con un grupo protector (4-metoxifenil)difenilmetilo ("Mmt"), que es lábil a ácidos muy suaves tales como ácido acético y trifluoroetanol en diclorometano (véase Dubowchik y col., Tetrahedron Lett., 1997, 38(30), 5257). Por lo tanto, si el grupo amino N-terminal y todas las funcionalidades de la cadena lateral están protegidos con grupos protectores sólo lábiles a ácidos fuertes, el grupo Mmt puede eliminarse selectivamente usando, por ejemplo, una mezcla de ácido acético y trifluoroetanol en diclorometano (por ejemplo, en una relación 1:2:7). El grupo amino libre resultante puede conjugarse luego con la fracción de unión a albúmina, por ejemplo, mediante acilación.

Como alternativa, la fracción de unión a albúmina se puede introducir junto con la lisina durante la síntesis de péptidos utilizando un bloque de construcción prefuncionalizado como compañero de acoplamiento. Ejemplos de dichos elementos estructurales prefuncionalizados incluyen Fmoc-L-Lys(Palm-L-Glu-OtBu)-OH y Fmoc-L-Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆-C(O)OtBu]-OH.

Si se desea, se puede modificar el extremo N de la cadena peptídica, por ejemplo mediante acetilación. Para la síntesis de péptidos de amida C-terminal, las resinas que incorporan enlazadores Rink amida 4-metilbencidrilamina (MBHA) o Rink amida AM se usan normalmente con la síntesis Fmoc, mientras que la resina MBHA se usa generalmente con la síntesis tBoc.

Una vez completada la síntesis, los péptidos se escinden del soporte de fase sólida con desprotección simultánea de la cadena lateral utilizando métodos de tratamiento estándar. Esto se puede lograr usando el cóctel de King (King y col., Int. J. Peptide Protein Res., 1990, 36, 255-266) o cócteles de escisión similares conocidos en la técnica.

La materia prima se puede purificar mediante cromatografía (por ejemplo, mediante RP-HPLC preparativa) si es necesario. Los péptidos brutos normalmente se purifican usando RP-HPLC en columnas C8 o C18 usando gradientes de agua-acetonitrilo en ácido trifluoroacético (TFA) del 0,05 al 0,1 %. La pureza de los péptidos puede verificarse mediante RP-HPLC analítica. La identidad de los péptidos puede verificarse mediante espectrometría de masas. Los compuestos se pueden aislar en forma sólida (por ejemplo, como polvos secos) usando técnicas tales como liofilización.

La presente divulgación también se refiere a compuestos intermedios para su uso en la síntesis de los presentes compuestos. En particular, se proporciona un compuesto que es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I) divulgada en la presente memoria, en donde los residuos X1 a X11 y X13 a X38 tienen los significados citados en relación con la Fórmula (I) y X12 es lisina (K); o una sal del mismo. Dicho compuesto se puede usar como intermedio en la preparación de los compuestos de la divulgación, que se pueden obtener conjugando la fracción de unión a albúmina con el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina en X12. La adición de la fracción de unión a albúmina se puede realizar mientras el péptido todavía está unido a la fase sólida. Después de añadir la fracción de unión a albúmina, el péptido puede liberarse de la resina y purificarse.

En los ejemplos siguientes se describen procesos particulares para preparar los compuestos de la divulgación. Las etapas de síntesis específicas para cada una de las rutas descritas se pueden combinar de diferentes maneras para preparar los compuestos. Los reactivos y materiales de partida están fácilmente disponibles o pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica.

Composiciones farmacéuticas

55 También se divulgan en la presente memoria composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de la divulgación y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Una composición farmacéutica puede contener de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 99,9 % en peso de un compuesto de la divulgación y de aproximadamente 99,9 % a aproximadamente 0,1 % en peso de uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. En un ejemplo, una composición farmacéutica comprende entre aproximadamente un 5 % y aproximadamente un 75 % en peso del compuesto de la divulgación, siendo el resto vehículos, diluyentes o excipientes farmacéuticos adecuados. Los métodos para preparar composiciones farmacéuticas son conocidos, o serán evidentes, para los expertos en esta técnica, por ejemplo, de bibliografía como Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22^a Edición, Pharmaceutical Press.

65 En una realización, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes terapéuticos adicionales.

La composición farmacéutica puede ser adecuada para administración por vía parenteral, por ejemplo, administración oral, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, pulmonar o transdérmica. En particular, la composición farmacéutica puede ser adecuada para administración subcutánea. En una realización, la composición farmacéutica es una composición lista para usar adecuada para la administración mediante una pluma o un dispositivo autoinyector.

Los compuestos pueden presentar una solubilidad, estabilidad química y/o estabilidad física deseables, especialmente en disolventes a valores de pH fisiológicos y disolventes que contienen conservantes antimicrobianos tales como fenol o metacresol. Como consecuencia, los compuestos pueden ser particularmente adecuados para su uso en composiciones farmacéuticas en forma de solución.

En una realización particular, la composición farmacéutica es una solución que comprende un disolvente y, disuelto en el mismo, un compuesto de la divulgación y un conservante antimicrobiano seleccionado entre fenol y metacresol; en donde el compuesto de la divulgación está presente en una cantidad de al menos 1 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 10 mg/ml o al menos 20 mg/ml; y en donde la solución tiene un pH de 6 a 8 (por ejemplo, pH 7,0 o pH 7,4) medido a 25 °C.

Uso en terapia

Los compuestos de la divulgación son útiles en terapia y pueden usarse para tratar o prevenir diversas enfermedades. Por tanto, en otros aspectos, la divulgación se refiere al uso de los compuestos en terapia y a métodos terapéuticos en donde se administra a un paciente una cantidad eficaz de un compuesto de la divulgación. La divulgación también se refiere al uso de los compuestos para la fabricación de medicamentos para su uso en terapia. Los compuestos son especialmente útiles en la terapia de enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante agonismo del receptor CRF2.

El término “terapia”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere al tratamiento o prevención de una enfermedad en un paciente.

El término “tratar” o “tratamiento”, tal como se utiliza en la presente memoria incluye prohibir, restringir, ralentizar, detener o revertir la progresión o gravedad de una enfermedad existente en un paciente. El tratamiento puede eliminar una enfermedad; detener o ralentizar una enfermedad en un paciente; inhibir o ralentizar el desarrollo de una nueva enfermedad en un paciente; disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas y/o recurrencias en un paciente que actualmente tiene o que ha tenido previamente una enfermedad; y/o prolongar, es decir, aumentar, la esperanza de vida del paciente. En particular, el tratamiento de una enfermedad puede dar como resultado curar, acortar la duración, mejorar, ralentizar o inhibir la progresión o el empeoramiento de una enfermedad o sus síntomas.

El término “prevenir” o “prevención”, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a inhibir o retrasar la aparición de una enfermedad o dolencia en un paciente.

El término “enfermedad”, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier afección o trastorno que daña o interfiere con la función normal de una célula, tejido u órgano.

El término “paciente”, tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a un mamífero, tal como un ser humano, un ratón, un conejillo de indias, una rata, un perro o un gato. En una realización particular, el paciente es un paciente humano.

La expresión “cantidad eficaz”, tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a la cantidad o dosis del compuesto de la divulgación que, tras la administración de dosis única o múltiple al paciente, proporciona el efecto deseado en el paciente. El médico responsable puede determinar fácilmente una cantidad eficaz mediante el uso de técnicas conocidas y observando los resultados obtenidos en circunstancias análogas. Para determinar la cantidad eficaz para un paciente, el médico que establece el diagnóstico considera varios factores, incluidos, entre otros: la especie de mamífero; su tamaño, edad y estado de salud general; la enfermedad o enfermedad específica implicada; el grado de afectación o la gravedad de la enfermedad o dolencia; la respuesta del paciente individual; el compuesto particular administrado; el modo de administración; las características de biodisponibilidad del preparado administrado; el régimen de dosis seleccionado; el uso de medicación concomitante; y otras circunstancias relevantes.

Los compuestos de la divulgación pueden ser eficaces en un amplio intervalo de dosificación. Por ejemplo, las dosis por día pueden estar dentro del intervalo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal.

Se ha observado que los compuestos de la divulgación tienen una excelente estabilidad en los diferentes ambientes probados. En consecuencia, los compuestos de la divulgación son particularmente adecuados, en realizaciones en donde los compuestos se administran mediante administración una vez al día, una vez a la semana, bimensual o mensual. Este es en particular el caso de los compuestos de la divulgación con una D-valina en 7, lisina derivatizada con un ácido graso como se proporciona en la presente memoria para la prolongación de la semivida en la posición 12, con una potencia excelente en CRF2 y un perfil de selectividad suficiente por CRF1.

Los compuestos se pueden administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales. La expresión “en combinación con”, tal como se utiliza en la presente memoria, significa la administración del compuesto de la divulgación ya sea de manera simultánea, secuencial o en una única formulación combinada con los uno o más agentes terapéuticos adicionales.

Los compuestos de la divulgación se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por inhalación, administración subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, pulmonar o transdérmica.

En una realización particular, los compuestos se administran mediante administración subcutánea. Los compuestos pueden ser administrados por un médico o autoadministrados usando un dispositivo de inyección. Se entiende que el tamaño del calibre y la cantidad de volumen de inyección los determina el profesional experto. En una realización, la cantidad de volumen de inyección es menor o igual a 2 ml, por ejemplo, menor o igual a 1 ml. En otra realización, se usa un calibre de aguja mayor o igual a 27, por ejemplo, mayor o igual a 29. La administración se puede realizar utilizando un autoinyector o un dispositivo de administración multidosis.

Los compuestos de la divulgación pueden ser útiles en la terapia de enfermedades que pueden tratarse o prevenirse mediante agonismo del receptor CRF2.

Los compuestos son particularmente útiles en el tratamiento o prevención de la sarcopenia, hipertensión pulmonar, distrofia muscular, enfermedad renal, enfermedad arterial periférica (PAD), enfermedades cardiovasculares que incluyen especialmente insuficiencia cardíaca, obesidad y diabetes. Por lo tanto, las realizaciones de la divulgación se refieren al uso de los compuestos en el tratamiento o prevención de sarcopenia, hipertensión pulmonar, distrofia muscular, enfermedad renal, enfermedad arterial periférica (PAD), enfermedad cardiovascular que incluye especialmente insuficiencia cardíaca, obesidad o diabetes en un paciente. La divulgación también se refiere a métodos para tratar o prevenir la sarcopenia, hipertensión pulmonar, distrofia muscular, enfermedad renal, enfermedad arterial periférica (PAD), enfermedad cardiovascular incluyendo especialmente insuficiencia cardíaca, obesidad o diabetes en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de un compuesto de la divulgación al paciente. Además, la divulgación se refiere al uso de los compuestos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular que incluye especialmente insuficiencia cardíaca, obesidad o diabetes en un paciente.

Ejemplos de enfermedades cardiovasculares que pueden tratarse o prevenirse utilizando los presentes compuestos incluyen insuficiencia cardíaca, hipertensión, dislipidemia, aterosclerosis, arteriosclerosis, enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular. El efecto de los compuestos en estas afecciones puede ser el resultado de o estar asociado con su efecto sobre el peso corporal o puede ser independiente del mismo. En una realización particular, los compuestos se usan para tratar o prevenir la insuficiencia cardíaca. El compuesto se puede administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, tales como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), bloqueadores de los receptores de angiotensina II (BRA), diuréticos, inhibidores de los cotransportadores de glucosa y sodio (SGLT), betabloqueantes, antagonistas de mineralocorticoides o inhibidores de neprilisina.

Los compuestos también pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la obesidad y otras enfermedades causadas o caracterizadas por un exceso de peso corporal, tales como inflamación relacionada con la obesidad, enfermedad de la vesícula biliar relacionada con la obesidad y apnea del sueño inducida por la obesidad. En términos de un paciente humano adulto, la obesidad se puede definir como un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 30 kg/m². El IMC es un índice simple de peso para la talla que se utiliza comúnmente para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. Se define como el peso de una persona en kilogramos dividido por el cuadrado de su altura en metros y por lo tanto se expresa en unidades de kg/m². El compuesto se puede administrar en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de la obesidad. Como alternativa o adicionalmente, el tratamiento puede combinarse con dieta y ejercicio.

Los compuestos también pueden usarse en el tratamiento o prevención de la diabetes, especialmente la diabetes de tipo II. Los compuestos se pueden administrar solos o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales útiles en el tratamiento de la diabetes, por ejemplo, uno o más agentes seleccionados de metformina, tiazolidinedionas (TZD), sulfonilureas (SU), dipeptidil peptidasa-IV (DPP- IV) inhibidores, agonistas del péptido 1 similar al glucagón (GLP1) y cotransportadores de glucosa y sodio (SGLT). Como alternativa o adicionalmente, el tratamiento puede combinarse con dieta y ejercicio. Los compuestos también pueden usarse para tratar o prevenir la hiperglucemia, la diabetes tipo I y la intolerancia a la glucosa. Los compuestos también pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de la diabetes.

Los compuestos también pueden ser útiles en el tratamiento o prevención de otras enfermedades tales como sarcopenia, hipertensión pulmonar, enfermedad renal, enfermedad arterial periférica (PAD), síndrome metabólico, enfermedad renal crónica, enfermedades degenerativas (por ejemplo, enfermedades neurodegenerativas) o enfermedades acompañadas de náuseas o vómitos.

La presente invención se ilustra mejor mediante los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con fines ilustrativos. Los ejemplos no deben interpretarse como limitativos del alcance o contenido de la divulgación de ninguna manera.

5 Ejemplos

Abreviaturas

Se utilizan ciertas abreviaturas en los ejemplos y en otros lugares de la presente memoria:

- 10 “AA” se refiere a aminoácido;
- “AEEA” se refiere a [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo;
- 15 “Aib” se refiere a ácido 2-amino-isobutírico;
- “AUC” se refiere al área bajo la curva;
- “AMPc” se refiere a monofosfato de adenosina cíclico;
- 20 “Boc” se refiere a terc-butiloxycarbonilo;
- “BOP” se refiere a hexafluorofosfato de (benzotriazol-1-iloxi)tris(dimetilamino)fosfonio;
- 25 “BSA” se refiere a seroalbúmina bovina;
- “tBu” se refiere a butilo terciario;
- “DCM” se refiere a diclorometano;
- 30 “Dde” se refiere a 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-etilo;
- “IvDde” se refiere a 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metil-butilo;
- 35 “DIC” se refiere a N,N'-diisopropilcarbodiimida;
- “DIPEA” se refiere a N,N-diisopropiletilamina;
- “DMEM” se refiere al medio Eagle modificado por Dulbecco;
- 40 “DMF” se refiere a dimetilformamida;
- “DMSO” se refiere a sulfóxido de dimetilo;
- 45 “EDT” se refiere a etanoditio;
- “FA” se refiere a ácido fórmico;
- “FBS” se refiere a suero bovino fetal;
- 50 “Fmoc” se refiere a fluorenilmetiloxycarbonilo;
- “gGlu” se refiere a gamma-glutamato (γ E);
- 55 “HATU” se refiere a hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametiluronio;
- “HBSS” se refiere a la solución salina equilibrada de Hanks;
- “HBTU” se refiere a hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio;
- 60 “HEPES” se refiere a ácido 2-[4-(2-hidroxi)etil]piperazin-1-il]etanosulfónico; “HOAt” se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol;
- “HOBt” se refiere a 1-hidroxibenzotriazol;
- 65 “HOSu” se refiere a N-hidroxisuccinimida;

“HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alta resolución;

“h” se refiere a hora;

“HTRF” se refiere a fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo;

“IBMX” se refiere a 3-isobutil-1-metilxantina;

“i.v.” se refiere a intravenoso;

“kDa” se refiere a kilodaltons;

“LC/MS” se refiere a cromatografía líquida/espectrometría de masas;

“Mmt” se refiere a monometoxi-tritilo;

“MS” se refiere a espectrometría de masas;

“OtBu” se refiere a O-terc-butilo;

“Palm” se refiere a palmitoilo;

“Pbf” se refiere a 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo;

“PBS” se refiere a solución salina tamponada con fosfato;

“FC” se refiere a farmacocinética;

“RP-HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa;

“s.c.” se refiere a subcutáneo;

“EEM” se refiere al error estándar de la media;

“Etea” se refiere a estearilo;

“TIPS” se refiere a triisopropilsilano;

“TFA” se refiere a ácido trifluoroacético;

“Trt” se refiere a tritilo; y

“UV” se refiere a ultravioleta.

Materiales y métodos

Se emplearon los siguientes materiales de partida y métodos en los procedimientos de síntesis descritos en los ejemplos.

Se utilizaron resinas Rink-Amida (por ejemplo, resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamidonorleucilaminometilo, Merck Biosciences; resina de 4-[(2,4-dimetoxifenil) (Fmoc-amino)metil]fenoxiacetamidometilo, Agilent Technologies) para la síntesis de amidas peptídicas con cargas en el intervalo de 0,2-0,7 mmol/g. Como alternativa, se utilizaron resinas Wang precargadas (por ejemplo, resina de (1-(terc-butoxi)-3-oxopropan-2-il)carbamato de ((S)-(9H-fluoren-9-il)metilo, resina Fmoc-Ser(tBu)-Wang, Bachem) para la síntesis de ácidos peptídicos con cargas en el intervalo de 0,2-0,7 mmol/g.

Los aminoácidos naturales protegidos con Fmoc se adquirieron en Protein Technologies Inc., Senn Chemicals, Merck Biosciences, Novabiochem, Iris Biotech, Bachem, Chem-Impex International o MATRIX Innovation. En la síntesis se utilizaron los siguientes aminoácidos convencionales: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OtBu)-OH, Fmoc-L-Cys(Trt)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-L-His(Trt)-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Met-OH, Fmoc-L-Phe-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Trp(Boc)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH. Además, los siguientes aminoácidos se adquirieron en los mismos proveedores que antes: Fmoc-L-Lys(ivDde)-OH, Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-D-Ser(tBu)-OH, Fmoc-D-Ala-OH y Boc-L-Tyr(tBu)-OH.

Los siguientes elementos estructurales de cadenas laterales se adquirieron de fuentes comerciales o se sintetizaron mediante síntesis por etapas o síntesis en fase sólida como se describe, por ejemplo, en el documento CN104356224 (Liu; Hangzhou Adlai Nortye Pharmaceutical Technology Co. Ltd.): Fmoc-L-Lys(Palm-L-Glu-OtBu)-OH; Fmoc-L-Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu]-OH; Fmoc-AEEA-OH; Fmoc-AEEA-AEEA-OH; Fmoc-L-Ile-Aib-OH; y Boc-L-Tyr-Aib-OH.

Los siguientes elementos estructurales de la cadena lateral se adquirieron de fuentes comerciales (por ejemplo, Chengdu Pukang) o se sintetizaron mediante una síntesis por etapas o una síntesis en fase sólida como se describe en el documento WO2009022006 (Madsen; Novo Nordisk A/S), documento WO2009115469 (Madsen; Novo Nordisk A/S) o el documento WO2015028966 (Barlos; Chemical & Biopharmaceutical Laboratories of Patras S.A.): HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu; HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)-(CH₂)₁₈C(O)OtBu; HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)}₂C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu; HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)}₂-C(O)(CH₂)₁₈-C(O)OtBu; HO-C(O)(CH₂)₁₈C(O)OtBu; HO-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu; y HO-gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₈C(O)OtBu.

Los péptidos brutos se purificaron en un sistema Akta Purifier, un sistema HPLC semipreparado Jasco, un sistema HPLC Agilent 1100 o un sistema HPLC similar. Se utilizaron columnas preparativas RP-C18-HPLC de diferentes tamaños y con diferentes caudales dependiendo de la cantidad de péptido bruto a purificar. En concreto, se utilizaron las siguientes columnas: Waters XSelect CSH C18 OBD Prep 5 μ m 30 x 250 mm, Waters SunFire C18 OBD Prep 5 μ m 30 x 250 mm, Waters SunFire C18 OBD Prep 5 μ m 50 x 150 mm y Phenomenex Luna Prep C18 5 μ m 21,2 x 250 mm. Como eluyentes se emplearon acetonitrilo (B) y agua + TFA 0,1 % (A) o agua + FA 0,1 % (A). Las fracciones que contenían el producto se recogieron y liofilizaron para obtener el producto purificado, normalmente como una sal de TFA.

Como alternativa, los compuestos se aislaron como sales acetato mediante el siguiente procedimiento: El compuesto se disolvió en agua y la solución se ajustó a pH 7,05 con NaHCO₃. A continuación, el compuesto disuelto se purificó con un RP Kinetex 21,2 x 250 mm (volumen de columna VC 88 ml, 5 μ m, C18, 100A, Åkta avant 25). La columna se equilibró con disolvente A (3 x VC), se inyectó el compuesto y luego se lavó con una mezcla de disolvente A (95 %) y disolvente B (5 %) con 3 VC. A continuación, se realizó un gradiente de disolvente A:B (95:5) a A:B (20:80) con 15 VC. El péptido purificado se recogió y liofilizó. Columna: Kinetex AXIA 5 μ m C18 21,2 x 250 mm; disolvente: A (H₂O + ácido acético 0,5 %); B (ACN + H₂O + ácido acético 0,5 %) (flujo 7 ml/min); gradiente: 95:5 (0 min) a 95:5 (37 min) a 20:80 (180 min) a 0:100 (6 min)

Se llevó a cabo un proceso de HPLC / UHPLC analítica según uno de los siguientes métodos:

Método A:

detección a 214 nm

columna: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 μ m (150 x 2,1 mm) a 50 °C

disolvente: H₂O+TFA 0,05 % : ACN + TFA 0,045 % (flujo 0,5 ml/min)

gradiente: 80:20 (0 min) a 80:20 (3 min) a 25:75 (23 min) a 5:95 (23,5 min) a 5:95 (26,5 min) a 80:20 (27 min) a 80:20 (33 minutos)

opcionalmente con analizador de masas: LCT Premier, modo de iones positivos por electropulverización

Método B:

detección a 214 nm

columna: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 μ m (150 x 2,1 mm) a 50 °C

disolvente: H₂O+TFA 0,05 % : ACN + TFA 0,035 % (flujo 0,5 ml/min)

gradiente: 80:20 (0 min) a 80:20 (3 min) a 25:75 (23 min) a 2:98 (23,5 min) a 2:98 (30,5 min) a 80:20 (31 min) a 80:20 (37 minutos)

analizador de masas: Agilent 6230 Accurate-Mass TOF o Agilent 6550 iFunnel Q-TOF; ambos equipados con una fuente de iones ESI Dual Agilent Jet Stream.

Método C:

detección a 214 nm

ES 2 988 026 T3

columna: Waters ACQUITY UPLC® CSH™ C18 1,7 µm (150 × 2,1 mm) a 70 °C
disolvente: H₂O+TFA 0,05 % : ACN + TFA 0,035 % (flujo 0,5 ml/min)
5 gradiente: 63:37 (0 min) a 63:37 (3 min) a 45:55 (23 min) a 2:98 (23,5 min) a 2:98 (30,5 min) a 63:37 (31 min) a 63:37 (38 minutos)
analizador de masas: Agilent 6230 Accurate-Mass TOF, Agilent Jet Stream ESI

10 Ejemplo 1: Síntesis de compuestos mediante procedimiento automatizado de péptidos en fase sólida

Los compuestos se prepararon mediante síntesis en fase sólida usando un sintetizador de péptidos Prelude (Mesa Laboratories/Gyros Protein Technologies) o un sintetizador automatizado CS Bio usando química Fmoc estándar y activación HBTU/DIPEA o HATU/DIPEA. Se utilizó DMF como disolvente.

15 Se emplearon las siguientes condiciones:

Desprotección: Piperidina 20 %/DMF durante 2 × 2,5 min.

20 Lavados: 7 x DMF.

Acoplamiento 2:5:10 AA 200 mM / 500 mM HBTU 500 mM / DIPEA 2 M en DMF 2 x durante 20 min.

Lavados: 5 x DMF.

25 Se utilizó activación con HBTU/DIPEA para todos los acoplamientos estándar. Se utilizó la activación HATU/DIPEA para los siguientes acoplamientos: Ile-Aib, Aib-Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu], Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu]-Asp, Gln-Aib y Leu-Leu. Los acoplamientos HATU se dejaron reaccionar en general 2 × durante 40 min, a veces 2 × durante 1 h, y también hasta 12 h.

30 Para la cadena lateral de lisina modificada, se usó Fmoc-L-Lys(Mmt)-OH en la posición indicada como X12 en la Fórmula (I). Después de completar la síntesis, el grupo Mmt se eliminó mediante tratamiento repetido con AcOH/TFE/DCM (1/2/7) durante 15 minutos a temperatura ambiente, después de lo cual la resina se lavó repetidamente con DCM, DIPEA 5 % en DCM y DIPEA 5 % en DCM/DMF.

35 Después de eliminar el grupo Mmt, la resina se trató con una solución de la fracción de unión a albúmina en forma protegida. A modo de ilustración, los péptidos que comprenden una fracción - $\{AEEA\}_2$ -gGlu-C(O)(CH₂)₁₆COOH se prepararon tratando la resina con una solución de HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu (1 eq) en DMF preactivado con HATU (3 eq), HOAt (3 eq) y DIPEA (4 eq). A continuación se lavó la resina igual que antes. Los grupos protectores OtBu se escindieron en la escisión final del péptido de la resina.

40 La escisión de los péptidos de la resina se realizó usando un cóctel de escisión de King que consistía en 82,5 % de TFA, 5 % de fenol, 5 % de agua, 5 % de tioanisol y 2,5 % de EDT o un cóctel de escisión modificado que consistía en 82,5 % de TFA, 5 % de fenol, 5 % de agua, 5 % de tioanisol y 2,5 % de DODT. Las resinas empleadas en la síntesis fueron tales que el C-terminal se escindió de la resina como una amida primaria.

45 A continuación, los péptidos brutos se precipitaron en éter dietílico o diisopropílico, se centrifugaron y se liofilizaron. Los péptidos se analizaron mediante HPLC analítica y se verificaron mediante espectrometría de masas ESI. Los péptidos brutos se purificaron mediante un procedimiento de purificación por RP-HPLC preparativa estándar.

50 Ejemplo 2: Síntesis de compuestos mediante procedimiento manual de síntesis en fase sólida

Los compuestos también se prepararon mediante un procedimiento de síntesis manual. A continuación se describe un procedimiento ilustrativo.

55 Se colocó resina MBHA de amida Rink desecada (0,3 g; 0,5-0,8 mmol/g) en un recipiente de polietileno equipado con un filtro de polipropileno. La resina se hinchó en DCM (15 ml) durante 1 h y DMF (15 ml) durante 1 hora. El grupo Fmoc de la resina se desprotegió tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 y 15 minutos. La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Se usó una prueba de Kaiser (un método cuantitativo; véase Kaiser y col., Anal. Biochem., 1970, 34, 595-598) para confirmar la eliminación de Fmoc del soporte sólido. El aminoácido Fmoc C-terminal (exceso de 5 equivalentes correspondiente a la carga de resina) en DMF seca se añadió a la resina desprotegida y se inició el acoplamiento del siguiente aminoácido Fmoc con un exceso de 5 equivalentes de DIC y HOBT en DMF. La concentración de cada reactivo en la mezcla de reacción fue aproximadamente 0,4 M. La mezcla se hizo girar en un rotor a temperatura ambiente durante 2 h. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). La prueba de Kaiser en la alícuota de resina peptídica al finalizar el acoplamiento fue negativa (es decir, no hay color en la resina). Después de la primera unión de aminoácidos, el

grupo amino sin reaccionar, si lo hubiera, en la resina se protegió terminalmente con anhídrido acético/piridina/DCM (1/8/8) durante 20 minutos para evitar cualquier eliminación de la secuencia. Después de la protección terminal, la resina se lavó con DCM/DMF/DCM/DMF (6/6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc en la resina de peptidilo unida al aminoácido C-terminal se desprotegió tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 y 15 minutos. La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). La prueba de Kaiser en la alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

Los aminoácidos restantes en la secuencia diana en la resina Rink amida MBHA se acoplaron secuencialmente usando un método Fmoc AA/DIC/HOBt usando un exceso de 5 equivalentes correspondiente a la carga de resina en DMF. La concentración de cada reactivo en la mezcla de reacción fue aproximadamente 0,4 M. La mezcla se hizo girar en un rotor a temperatura ambiente durante 2 h. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Después de cada etapa de acoplamiento y etapa de desprotección de Fmoc, se llevó a cabo una prueba de Kaiser para confirmar la integridad de la reacción.

Después de completar la secuencia lineal, el grupo épsilon-amino de lisina (protegido con Dde) se desprotegió usando hidrato de hidrazina al 2,5 % en DMF durante 15 min x 2 y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El extremo γ -carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo épsilon-amino de Lys usando un método Fmoc-Glu(OH)-OtBu con DIC/HOBt (exceso de 5 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se hizo girar en un rotor a temperatura ambiente durante 2 h. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno, 30 ml cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se desprotegió tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 y 15 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

Para los péptidos donde la ramificación de la cadena lateral contenía un ácido γ -glutámico adicional, se usó un segundo Fmoc-Glu(OH)-OtBu para la unión al grupo amino libre del ácido γ -glutámico con el método DIC/HOBt (exceso de 5 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se hizo girar en un rotor a temperatura ambiente durante 2 h. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno, 30 ml cada uno). El grupo Fmoc en el ácido γ -glutámico se desprotegió tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 y 15 minutos (25 ml). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en la alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

La unión de las fracciones de unión a albúmina se realizó como se describe en el Ejemplo 1. Los grupos protectores de t-butiléster se escindieron en la escisión final del péptido de la resina.

Como alternativa, se introdujo la fracción de unión a albúmina utilizando un bloque estructural prefuncionalizado donde la fracción ya estaba unida a la lisina como compañero de acoplamiento en la síntesis de péptidos. Este procedimiento evita la necesidad de una etapa de desprotección selectiva, así como la unión selectiva de los elementos estructurales de la cadena lateral en un intermedio de síntesis muy avanzado. A modo de ilustración, se utilizó el siguiente procedimiento para incorporar Fmoc-L-Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu]-OH en el péptido. Se lavan 0,67 mmol de resina peptídica que lleva un grupo amino con 20 ml de dimetilformamida. Se disuelven 2,93 g de Fmoc-L-Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆-C(O)OtBu]-OH en 20 ml de dimetilformamida junto con 310 mg de hidrato de hidroxibenzotriazol y 0,32 ml de diisopropilcarbodiimida. Después de agitar durante 5 min se añade la solución a la resina. La resina se agita durante 20 h y luego se lava 3 veces con 20 ml de dimetilformamida cada vez. Se toma una pequeña muestra de resina y se somete a la prueba de Kaiser y a la prueba del cloranilo (véase Vojkovsky, Peptide Research 1995, 8, 236-237).

Después del acoplamiento de la fracción de unión a albúmina, la resina de peptidilo se lavó con DCM (6 x 10 ml), MeOH (6 x 10 ml) y éter (6 x 10 ml) y se secó en desecadores de vacío durante la noche. La escisión del péptido del soporte sólido se logró tratando la resina peptídica con un cóctel de reactivos (92 % de TFA, 2 % de tioanisol, 2 % de fenol, 2 % de agua y 2 % de TIPS) a temperatura ambiente durante 3 a 4 horas. La mezcla de escisión se recogió mediante filtración y la resina se lavó con TFA (2 ml) y DCM (2 x 5 ml). El exceso de TFA y DCM se concentró hasta un pequeño volumen en atmósfera de nitrógeno y se añadió una pequeña cantidad de DCM (5-10 ml) al residuo y se evaporó en atmósfera de nitrógeno. El proceso se repitió 3-4 veces para eliminar la mayoría de las impurezas volátiles. El residuo se enfrió a 0 °C y se añadió éter anhidro para precipitar el péptido. El péptido precipitado se centrifugó, se eliminó el éter sobrenadante, se añadió éter fresco al péptido y se volvió a centrifugar. La muestra bruta se purificó mediante HPLC preparativa y se liofilizó. La identidad del péptido se confirmó mediante LCMS.

Ejemplo 3: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 35

El compuesto de id. de sec. n.º 35 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó una resina Novabiochem Rink-Amide (resina 4-(2',4' -dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-aminometilo), malla 100-200, carga de 0,36 mmol/g. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación de HBTU/DIPEA o activación de HATU/DIPEA dependiendo de la secuencia de aminoácidos. En la posición 12, se usó Fmoc-Lys(Mmt)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida. El grupo Mmt se escindió del péptido como se describe en el Ejemplo 1. En adelante se acopló HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu al grupo amino liberado

empleando DIPEA como base y HATU/HOAt como reactivos de acoplamiento. El péptido se separó de la resina con el cóctel de King. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa en una columna Waters (Waters SunFire C18 OBD Prep 5 µm 50 x 150 mm) usando un gradiente de acetonitrilo/agua (agua con TFA 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LCMS (Método B). La deconvolución de las señales de masa observadas bajo el pico con un tiempo de retención de 11,19 min reveló la masa del péptido 5154,09 que concuerda con el valor esperado de 5154,06.

Ejemplo 4: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 141

El compuesto de id. de sec. n.º 141 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó una resina Novabiochem Rink-Amide (resina 4-(2',4' -dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-aminometilo), malla 100-200, carga de 0,34 mmol/g. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación de HBTU/DIPEA o activación de HATU/DIPEA dependiendo de la secuencia de aminoácidos. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys[$\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)-C(O)(CH₂)₁₆-C(O)OtBu] en el protocolo de síntesis en fase sólida. El péptido se separó de la resina con el cóctel de King. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa primero en una columna Waters (Waters SunFire C18 OBD Prep 5 µm 50 x 150 mm) usando un gradiente de acetonitrilo/agua (agua con TFA 0,1 %) y posteriormente mediante HPLC preparativa en una columna Waters (Waters Xselect CSH Prep C18 5 µm 30 x 250 mm) usando un gradiente de acetonitrilo/agua (agua con 0,1 % de ácido fórmico). El péptido purificado se recogió y liofilizó. El péptido purificado se analizó mediante LCMS (Método B). La deconvolución de las señales de masa observadas bajo el pico con un tiempo de retención de 9,97 min reveló la masa del péptido 5163,18 que concuerda con el valor esperado de 5163,17.

Ejemplo 5: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 171

El compuesto de id. de sec. n.º 171 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó una resina Novabiochem Rink-Amide (resina 4-(2',4' -dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucil-aminometilo), malla 100-200, carga de 0,35 mmol/g. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación de HBTU/DIPEA o activación de HATU/DIPEA dependiendo de la secuencia de aminoácidos. En la posición 12, se usó Fmoc-Lys(Mmt)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida. El grupo Mmt se escindió del péptido como se describe en el Ejemplo 1. En adelante se acopló HO- $\{AEEA\}_2$ -gGlu(OtBu)₂-C(O)(CH₂)₁₆C(O)OtBu al grupo amino liberado empleando DIPEA como base y HATU/HOAt como reactivos de acoplamiento. El péptido se separó de la resina con el cóctel de King. El producto bruto se purificó mediante HPLC preparativa en una columna Waters (Waters SunFire C18 OBD Prep 5 µm 50 x 150 mm) usando un gradiente de acetonitrilo/agua (agua con TFA 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LCMS (Método B). La deconvolución de las señales de masa observadas bajo el pico con un tiempo de retención de 9,94 min reveló la masa del péptido 5294,21 que concuerda con el valor esperado de 5294,13.

Ejemplo 6: Síntesis de otros péptidos

Los siguientes péptidos se sintetizaron siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 1-5. Las masas calculadas y observadas y los tiempos de retención de estos péptidos se indican en la Tabla 3 a continuación, junto con los de los compuestos de los Ejemplos 3-5:

Tabla 3

45

Id. de sec. n.º	Masa calc.	Masa observada	Tiempo de retención [min]
1	4650,68	4650,64	13,55
2	4721,75	4721,79	12,18
3	4748,80	4748,84	11,69
4	4664,78	4664,80	11,26
5	4802,92	4802,91	10,44
6	4829,96	4829,99	10,26
7	1224,49	1224,92 (M/4+H)+	13,50
8	4741,90	4741,93	10,13
9	1216,2	1216,33 (M/4+H)+	11,40
10	4899,97	4899,99	9,77
11	4784,91	4784,91	9,97
12	4812,95	4812,92	9,52

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Masa calc.	Masa observada	Tiempo de retención [min]
13	5309,07	5309,09	9,60
14	4812,99	4812,95	9,38
15	4788,93	4788,95	9,88
16	5280,15	5280,18	9,28
17	1203,23	1202,60 (M/4+H)+	11,96
18	5006,03	5006,03	9,81
19	1242,51	1243,5 (M/4+H)+	11,66
20	1242,28	1242,6 (M/4+H)+	11,52
21	1235,51	1236,4 (M/4+H)+	11,56
22	1292,84	1292,67 (M/4+H)+	10,60
23	1242,28	1242,8 (M/4+H)+	11,52
24	5354,19	5354,21	8,62
25	4949,08	4949,10	9,36
26	4906,04	4906,06	9,59
27	4949,05	4949,06	9,52
28	4906,08	4906,09	9,407
29	4863,04	4863,04	9,80
30	4906,04	4906,05	9,62
31	4962,99	4962,99	10,11
32	4977,01	4977,02	10,04
33	4978,99	4978,99	10,04
34	5248,13	5248,15	8,39
35	5154,06	5154,09	11,19
36	1329,36	1329,05(M/4+H)+	9,93
37	5326,16	5326,18	8,33
38	5283,11	5283,16	8,54
39	1290,04	1289,95(M/4+H)+	10,82
40	1297,06	1296,96(M/4+H)+	10,87
41	1066,09	1065,90(M/5+H)+	10,56
42	1057,47	1057,29(M/5+H)+	10,76
43	1278,82	1278,82(M/4+H)+	10,81
44	1282,81	1282,67(M/4+H)+	10,77
45	1261,05	1260,94(M/4+H)+	11,14
46	1268,06	1267,94(M/4+H)+	11,08
47	5236,06	5236,09	11,42
48	5137,97	5137,99	11,14
49	5252,06	5252,12	10,37
50	5239,08	5239,07	9,68
51	5275,09	5275,13	9,42
52	5289,12	5289,15	9,11
53	5262,07	5262,10	9,31
54	5245,08	5245,12	9,98

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Masa calc.	Masa observada	Tiempo de retención [min]
55	5233,08	5233,07	9,31
56	5174,01	5174,00	10,20
57	5174,04	5174,07	9,93
58	1336,11	1336,00 (M/4+H)+	11,01
59	1327,61	1327,45 (M/4+H)+	10,92
60	1331,12	1330,92 (M/4+H)+	10,85
61	1324,35	1324,15 (M/4+H)+	10,94
62	1320,1	1319,91 (M/4+H)+	11,1
63	1320,34	1320,17 (M/4+H)+	11,34
64	1755,8	1755,58 (M/3+H)+	10,99
65	1736,1	1735,83 (M/3+H)+	11,46
66	1302,33	1302,18 (M/4+H)+	11,32
67	5154,03	5154,01	10,11
68	5154,04	5154,02	10,13
69	5138,99	5138,98	9,49
70	5111,00	5111,04	10,68
71	5138,01	5138,06	9,94
72	5138,01	5138,05	10,66
73	5138,04	5138,02	10,31
74	5225,04	5224,99	10,20
75	5137,06	5137,09	10,26
76	5066,93	5066,97	11,09
77	5180,14	5180,13	9,61
78	5126,95	5126,95	10,19
79	5110,98	5111,01	10,46
80	1290,55	1290,39 (M/4+H)+	11,28
81	1286,56	1286,41 (M/4+H)+	11,52
82	5211,11	5211,07	9,12
83	5181,10	5181,06	10,03
84	1294,06	1293,90 (M/4+H)+	10,25
85	1297,08	1296,90 (M/4+H)+	10,60
86	1296,84	1296,70 (M/4+H)+	10,54
87	1296,85	1296,68 (M/4+H)+	10,43
88	1286,09	1285,89 (M/4+H)+	10,78
89	1286,08	1285,90 (M/4+H)+	10,87
90	1289,59	1289,43 (M/4+H)+	10,70
91	1289,84	1289,63 (M/4+H)+	10,35
92	1290,30	1290,14 (M/4+H)+	10,68
93	1293,35	1293,21 (M/4+H)+	10,46
94	1297,33	1297,16 (M/4+H)+	10,44
95	1301,08	1300,85 (M/4+H)+	10,25
96	1297,32	1297,16 (M/4+H)+	10,88

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Masa calc.	Masa observada	Tiempo de retención [min]
97	1300,83	1300,70 (M/4+H)+	10,48
98	1290,07	1289,91 (M/4+H)+	10,54
99	5165,16	5165,20	9,71
100	5095,07	5095,07	9,86
101	5224,16	5224,17	9,09
102	1297,08	1296,92 (M/4+H)+	11,12
103	1286,55	1286,34 (M/4+H)+	11,14
104	1286,31	1286,13 (M/4+H)+	10,99
105	1286,30	1286,12 (M/4+H)+	10,98
106	1308,07	1307,85 (M/4+H)+	10,94
107	1307,83	1307,65 (M/4+H)+	10,87
108	1286,08	1285,86 (M/4+H)+	10,70
109	1286,32	1286,09 (M/4+H)+	10,68
110	1286,07	1285,87 (M/4+H)+	10,81
111	1350,88	1350,70 (M/4+H)+	11,16
112	1336,38	1336,15 (M/4+H)+	-
113	1336,13	1335,92 (M/4+H)+	13,15
114	1325,35	1325,12 (M/4+H)+	11,49
115	1314,60	1314,40 (M/4+H)+	10,73
116	1293,09	1292,95 (M/4+H)+	10,63
117	1292,83	1292,64 (M/4+H)+	10,78
118	1292,84	1292,70 (M/4+H)+	10,86
119	1292,85	1292,66 (M/4+H)+	10,62
120	1318,36	1318,17 (M/4+H)+	-
121	1303,86	1303,68 (M/4+H)+	10,44
122	1303,60	1303,41 (M/4+H)+	10,59
123	1292,83	1292,63 (M/4+H)+	10,84
124	1292,59	1292,44 (M/4+H)+	-
125	1046,07	1045,90 (M/5+H)+	10,77
126	1028,86	1028,72 (M/5+H)+	11,02
127	1040,47	1040,26 (M/5+H)+	11,05
128	1307,10	1306,94 (M/4+H)+	11,04
129	1034,85	1034,63 (M/5+H)+	11,11
130	5165,09	5165,11	10,09
131	5165,05	5165,07	10,50
132	5252,08	5252,09	10,22
133	5251,14	5251,14	10,01
134	5165,13	5165,11	10,13
135	5164,10	5164,09	10,19
136	5164,18	5164,16	9,73
137	5266,14	5266,15	9,95
138	5208,17	5208,16	9,64

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	Masa calc.	Masa observada	Tiempo de retención [min]
139	5207,15	5207,14	9,82
140	5164,12	5164,11	10,36
141	5163,17	5163,18	9,97
142	5222,12	5222,15	10,61
143	5261,16	5261,17	8,97
144	5289,16	5289,21	9,43
145	5316,21	5316,27	9,28
146	5328,25	5328,24	9,62
147	5067,00	5067,01	10,82
148	5181,10	5181,14	10,86
149	5252,17	5252,21	9,82
150	5180,11	5180,10	10,37
151	5208,14	5208,15	10,06
152	5252,17	5252,18	9,54
153	5040,85	5040,82	13,61
154	5169,98	5170,00	10,41
155	5197,03	5197,07	10,13
156	5009,95	5009,91	10,67
157	5208,05	5208,08	12,36
158	5266,05	5266,11	12,20
159	5267,00	5267,07	12,93
160	5240,94	5240,96	13,57
161	5268,93	5268,97	13,36
162	5224,99	5225,02	11,31
163	5233,01	5233,03	10,55
164	5152,97	5153,01	11,42
165	5166,98	5166,98	11,06
166	5224,99	5224,97	10,86
167	5153,92	5153,95	11,54
168	5225,94	5225,96	11,53
169	5225,94	5225,96	11,58
170	5226,88	5226,92	12,42
171	5294,13	5294,21	9,94
172	5322,16	5322,17	10,63
173	5193,12	5193,15	10,82
174	5292,21	5292,24	9,71
175	5191,20	5191,23	10,89
176	5336,19	5336,23	9,99
177	5364,22	5364,22	10,70
178	5235,18	5235,20	10,87
179	4874,94	4874,97	10,46
180	4873,02	4873,01	10,51

Id. de sec. n.º	Masa calc.	Masa observada	Tiempo de retención [min]
181	4917,00	4916,97	10,39
182	4745,90	4745,91	11,12
183	4743,98	4743,99	10,89
184	4787,96	4787,97	10,69
185	1325,38	1325,14 (M/4+H)+	-

Ejemplo 7: Evaluación de la actividad en el receptor CRF2 α humano

5 El agonismo de los compuestos para el factor 2 α liberador de corticotropina humano (receptor CRF2 α) se determinó mediante ensayos funcionales que miden la respuesta al AMPc de una línea celular TeloHEAC que expresa establemente el receptor CRF2 α humano.

10 Las células se cultivaron en un matraz de cultivo T175 colocado a 37 °C hasta casi la confluencia en el medio (DMEM l FBS 10 %) y se recogieron en viales de 2 ml en medio de cultivo celular que contenía DMSO 10 % en una concentración de 10-50 millones de células/ml. Cada vial contenía 1,8 ml de células. Los viales se congelaron lentamente a -80 °C en isopropanol y luego se transfirieron a nitrógeno líquido para su almacenamiento. Antes de su uso, las células congeladas se descongelaron rápidamente a 37 °C y se lavaron (5 min a 900 rpm) con 20 ml de tampón celular (1x HBSS; HEPES 20 mM; 0 % o 0,1 % de HSA). Las células se resuspendieron en tampón de ensayo (tampón celular más IBMX 2 mM) y se ajustaron a una densidad celular de 1 millón de células/ml. Para la medición, se añadieron 5 μ l de células (2000 células/pocillo finales) y 5 μ l del compuesto de prueba a una placa de 384 pocillos, seguido de una incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente.

20 El contenido de AMPc de las células se determinó utilizando un kit de Cisbio Corp. (n.º de catálogo 62AM4PEC) basado en HTRF (fluorescencia homogénea resuelta en tiempo). Después de la adición de reactivos HTRF diluidos en tampón de lisis (componentes del kit), las placas se incubaron durante 1 h, seguido de la medición de la relación de fluorescencia a 665/620 nm. El valor porcentual de actividad (E%) se calculó estableciendo 1000 nM de urocortina 2 (UCN2) como 100 %. La potencia *in vitro* de los compuestos se cuantificó determinando las concentraciones que causaron el 50 % de activación de la respuesta máxima (CE50).

25 Los valores representativos de CE50 se proporcionan en la Tabla 4 a continuación:

Tabla 4

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA	CE50 [nM], 0,1 % de HSA
1	0,01	-
2	0,01	0,01
3	0,01	-
4	0,04	-
5	0,04	-
6	0,16	0,18
7	0,02	0,03
8	0,20	-
11	0,02	-
12	0,09	-
13	0,98	64,1
14	0,18	-
15	0,88	-
16	0,30	-
17	0,02	-
18	0,03	-
19	0,01	-
20	0,01	-
21	0,02	-
22	0,12	-
23	0,02	-
24	6,95	-

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA	CE50 [nM], 0,1 % de HSA
25	0,09	-
26	0,01	-
27	0,01	-
28	0,14	-
29	0,12	-
30	0,16	-
31	0,01	-
32	0,01	-
33	0,20	-
34	6,88	-
35	0,24	3,82
36	1,45	-
37	1,60	-
38	20,90	-
39	0,65	-
40	15,40	-
41	15,60	-
42	15,40	-
43	1,90	-
44	13,70	-
45	3,77	-
46	0,52	-
47	6,85	-
48	2,20	-
49	12,70	-
50	17,20	-
51	0,32	21,4
52	0,70	45,8
53	1,01	55,1
54	0,57	24,5
55	48,50	-
56	22,90	-
57	38,80	-
58	0,28	-
59	0,15	17,4
60	0,48	-
61	0,38	-
62	0,80	-
63	0,63	-
64	13,20	-
65	9,31	-
66	25,40	-
67	0,57	-
68	0,20	-
69	0,61	-
70	0,91	-
71	3,15	-
72	0,65	-
73	2,60	-
74	2,12	-
75	0,48	-
76	13,40	-

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA	CE50 [nM], 0,1 % de HSA
77	0,33	-
78	10,60	-
79	0,46	-
80	0,90	92,52
81	0,14	18,5
82	10,10	-
83	0,07	2,99
84	1,85	61,7
85	0,10	3,58
86	0,11	5,7
87	0,23	16,2
88	0,68	25,7
89	0,30	15,6
90	3,91	92,6
91	14,30	-
92	9,17	-
93	50,90	-
94	1,73	49,1
95	25,00	-
96	0,38	-
97	1,66	-
98	2,36	-
99	0,06	1,6
100	0,51	20,5
101	0,11	4,28
102	0,07	-
103	0,84	-
104	0,32	-
105	0,41	15,3
106	0,53	13,2
107	0,81	16,1
108	0,23	-
109	0,95	-
110	0,18	-
112	0,66	68,9
113	0,10	11,9
114	0,16	12,4
115	2,77	-
116	0,70	-
117	0,11	-
118	0,04	2,13
119	0,13	4,97
120	1,27	61,1
121	0,73	41,3
122	0,04	1,71
123	0,33	9,74
124	0,11	4,37
125	0,47	19,9
126	0,22	5,59
127	0,16	5,14
128	0,64	20,1
129	0,15	3,02

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA	CE50 [nM], 0,1 % de HSA
130	0,05	2,11
131	0,11	2,44
132	0,38	8,76
133	0,09	3,19
134	0,07	3,44
135	0,04	1,48
136	0,05	2,41
137	0,04	1,78
138	0,06	3,12
139	0,03	1,31
140	0,04	1,27
141	0,03	0,97
142	0,05	1,42
143	1,44	93,8
144	1,36	76,3
145	1,46	96,9
146	0,11	4,36
147	0,18	8,17
148	0,29	14,3
149	0,06	2,54
150	0,07	3,99
151	0,08	3,87
152	0,09	4,94
153	33,70	-
154	15,00	15,28
155	8,87	-
156	1,06	-
157	0,12	2,53
158	0,42	5,63
159	1,27	27,4
160	8,56	28,9
161	36,00	977
162	2,00	30,46
163	0,24	3,91
164	0,69	10,1
165	0,28	5,06
166	0,90	14
167	3,95	74,4
168	13,90	-
169	4,01	98,1
170	62,09	-
171	0,17	2,62
172	0,04	2,76
173	0,03	3,49
174	0,07	0,88
175	0,06	3,64
176	0,11	3,05
177	0,07	5,19
178	0,04	3,77
179	0,03	1,88
180	0,05	1,74
181	1,18	15,3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA	CE50 [nM], 0,1 % de HSA
182	0,03	3,13
183	0,12	1,58
184	0,05	2,83
222	0,01	-
224	6,85	-

Ejemplo 8: Evaluación de la actividad en el receptor CRF2 a de rata

5 Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, se evaluó la actividad de los compuestos en el receptor CRF2R a de rata. En este estudio se utilizó la línea celular de músculo liso aórtico de rata A7R5.

Los valores representativos de CE50 se proporcionan en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5

10

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA
8	0,11
11	0,01
13	2,5
15	1,38
18	0,02
24	4,94
35	0,81
36	13,3
39	2,04
43	11,5
45	47,3
46	8,97
51	0,87
52	0,76
53	1,32
54	1,51
58	0,72
59	0,34
60	1,35
61	0,94
62	2,9
63	4,73
67	0,66
68	1,74
69	7,33
70	8,72
72	4,31
75	1,71
77	3,26
79	3,99
80	5,2

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA
81	0,94
83	1,83
85	0,73
86	0,69
87	1,49
99	0,62
100	7,52
101	1,02
130	0,13
131	0,39
132	0,79
135	0,13
136	0,38
137	0,14
138	0,26
139	0,1
140	0,1
141	0,05
142	0,2
146	0,22
147	2,53
151	0,49
157	1,14
158	5,29
159	15,6
162	48,57
163	1,5
164	12,6
165	2,41
166	9,99
167	76,9
173	0,83
174	0,42
182	0,59
183	1,12
184	0,42
225	0,12
226	0,04
227	0,61

Ejemplo 9: Evaluación de la actividad en el receptor CRF1 R antidiana

5 Usando el procedimiento descrito en el Ejemplo 7, se evaluó la actividad de los compuestos en el receptor CRF1R anti-diana. En este estudio se utilizó una línea celular CHO de sobreexpresión de CRF1 R.

ES 2 988 026 T3

Los valores representativos de CE50 y Emáx se proporcionan en la Tabla 6 a continuación:

Tabla 6

5

Id. de sec. n.º	CE50 [nM] 0 % de HSA	Emáx (%)
4	>1000	17,45
5	>1000	37,41
6	830	47,16
7	588	58,57
8	>1000	15,96
9	>1000	14,86
10	>1000	10,23
11	>1000	12,74
12	>1000	41,82
13	>1000	4,3
14	>1000	14,08
15	>1000	7,75
19	571	57,4
21	618	59,16
24	>1000	1,48
32	>1000	27,04
35	>1000	1,77
39	>1000	13,28
46	>1000	5,88
51	>1000	3,38
52	>1000	5,3
53	>1000	4,14
54	>1000	2,72
58	>1000	9,12
59	>1000	11,12
60	>1000	4,84
61	>1000	3,31
62	>1000	2,28
63	>1000	4,68
67	>1000	9,18
68	>1000	12,34
69	>1000	0,02
70	>1000	3,03
72	>1000	2,58
75	>1000	2,7
77	>1000	1,56
79	>1000	8,74
80	>1000	12,68
81	>1000	23,34

Id. de sec. n.º	CE50 [nM] 0 % de HSA	Emax (%)
83	>1000	7,51
85	>1000	0,14
86	>1000	15,9
87	>1000	-0,2
99	>1000	3,25
100	>1000	5,06
101	>1000	-0,34
130	>1000	20,3
132	>1000	36,94
135	>1000	28,4
136	>1000	21,75
137	>1000	22,5
138	>1000	4,38
139	>1000	37,61
146	>1000	1,03
147	>1000	4,54
151	>1000	9,07
160	>1000	20,76
161	>1000	3,42
164	>1000	25,82
165	>1000	26,95
166	>1000	5,94
167	>1000	-0,46
171	>1000	7,54
172	>1000	25,56

Ejemplo 10: Evaluación de la actividad en células que expresan CRF2 humano endógeno

El efecto agonista de los compuestos se evaluó en células NCI-H82 que expresan CRF2 humano endógeno.

5

Se sembraron células NCI-H82 en suspensión en placas de 384 pocillos de bajo volumen a una densidad de 30.000 células/pocillo en 5 µl de medio de ensayo (RPMI + IBMX 1 mM). Las placas se centrifugaron brevemente a 800 rpm para permitir que la suspensión celular se moviera al fondo de los pocillos y luego se incubaron durante 2 horas a 37 °C en CO2 al 5 %. A continuación se transfirieron 5 µl de compuestos experimentales a concentraciones apropiadas (10⁻¹¹ a 3×10⁻⁷) diluidos en medio de prueba en placas de 384 pocillos. Después de 5 minutos de activación, la reacción se detuvo mediante la adición de reactivos de revelación HTRF con un dispensador multigota. Los dos reactivos fueron 5 µl / pocillo de criptato de anti-AMPc diluido 20 veces en conjugado y tampón de lisis y 5 µl / pocillo de AMPc-D2 diluido 20 veces en conjugado y tampón de lisis. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente en la oscuridad, las placas se leyeron en un aparato Clariostar. La señal HTRF se leyó a 620 y 665 nm y se calculó de la siguiente manera: Relación HTRF = [(señal 665 nm)/(señal 620 nm)]x104. La medición de AMPc se calculó usando una curva de AMPc estándar (0,17 nM a 712 nM) dibujada en cada placa, a partir de la cual se determinaron los valores de la CE50.

10

15

Los valores representativos de la CE50 se proporcionan en la Tabla 7 a continuación:

20

Tabla 7

Id. de sec. n.º	CE50 [nM]
35	23
59	6,8

Id. de sec. n.º	CE50 [nM]
81	110
101	4,1
130	4,3
135	110
137	120
138	8,4
139	18
141	12
143	93
147	13
151	7,4

Ejemplo 11: Estudios de unión en células HEK que expresan CRF2 recombinante

La unión al receptor de los compuestos se evaluó utilizando un ensayo CRF2a(h)(radioligando agonista).

Se utilizaron células HEK que expresan CRF2 humano recombinante como fuente de receptor para la preparación de membranas. Se utilizó [125I]suvagina como ligando competitivo para el receptor CRF2. Los compuestos de prueba se incubaron durante una hora a varias concentraciones en competición con [125I]suvagina (0,1 nM) para determinar la unión residual. La unión del compuesto se calculó como un % de inhibición de la unión de [125I]suvagina específica para CRF2.

Los valores de CI50 (concentración que causa una inhibición media máxima de la unión específica del control) y los coeficientes de Hill (nH) se determinaron mediante análisis de regresión no lineal de las curvas de competencia generadas con valores medios replicados utilizando el ajuste de curvas de la ecuación de Hill. Las constantes de inhibición (Ki) se calcularon utilizando la ecuación de Cheng Prusoff [$K_i = CI_{50} / (1 + L/KD)$] donde L es la concentración de radioligando en el ensayo y KD es la afinidad del radioligando por el receptor). Se utilizó un diagrama de Scatchard para determinar la KD.

Los valores representativos de Ki y nH se proporcionan en la Tabla 8 a continuación:

Tabla 8

Id. de sec. n.º	Ki [nM]	nH
17	4,4	1,5
35	7,9	1,7
51	4,3	0,8
59	7,2	0,6
68	5,4	0,8

Ejemplo 12: Evaluación de la estabilidad química

La estabilidad química de los compuestos se evaluó almacenándolos en diversas condiciones y luego determinando la pérdida de pureza mediante UPLC-UV.

Antes de medir la estabilidad química de un lote de compuesto de prueba, se determinó la pureza del compuesto mediante UPLC/MS. Para las pruebas de estabilidad, la concentración diana fue 300 µM de compuesto puro. Por lo tanto, se prepararon soluciones de muestras sólidas en un sistema tampón de acetato 20 mM, pH 4,5, con una concentración de compuesto 300 µM basado en el % de pureza previamente determinado:

Las soluciones de los compuestos de prueba se filtraron a través de un filtro (tamaño de poro de 0,22 µM) y se llenaron en alícuotas en condiciones asépticas. En el punto de partida, se realizó una UPLC-UV mediante inyección de 2 µl de la muestra sin diluir. A continuación se almacenaron alícuotas durante 28 días a temperaturas de 5 y 40 °C. Después de este periodo de tiempo, las muestras se centrifugaron durante 15 min a 2500 RCF. Luego, se analizaron muestras de 2 µl del sobrenadante no diluido con UPLC-UV. La estabilidad química se calculó mediante la ecuación: [(pureza

después de 28 días a 5 °C) - (pureza después de 28 días a 40 °C)] / (pureza después de 28 días a 5 °C)] × 100 %. La pureza se calculó como: [(compuesto del área del pico) / (área total del pico)] × 100 %.

Los datos de estabilidad representativos se proporcionan en la Tabla 9 a continuación:

5

Tabla 9

Id. de sec. n.º	Pérdida de pureza relativa [%]
6	1,9
35	4,45
36	3,65
59	2,85
68	6,00
77	3,60
130	4,25
135	3,55
136	3,10
137	4,80
138	2,85
139	3,05
140	4,30
141	2,90

Ejemplo 13: Evaluación de la solubilidad

10

La solubilidad de los compuestos se evaluó en los siguientes sistemas tampón: Tampón acetato 100 mM, pH 4,5 (Tampón A); Tampón acetato 100 mM, pH 4,5, 2,7 mg/ml de m-cresol (Tampón B); y tampón fosfato 100 mM, pH 7,4 (Tampón C).

15

Antes de realizar las mediciones de solubilidad, la pureza de los compuestos se determinó mediante UPLC/MS. Para la prueba de solubilidad, la concentración diana fue 10 mg de compuesto puro/ml. Por lo tanto, se prepararon soluciones de muestras sólidas en un sistema tampón con una concentración de 10 mg/ml de compuesto basado en el % de pureza previamente determinado.

20

La UPLC-UV se realizó después de 1 hora de agitación suave del sobrenadante, que se obtuvo después de 15 minutos de centrifugación a 2500 RCF (aceleración centrífuga relativa). La solubilidad se determinó comparando el área del pico UV de una inyección de 2 µl de una muestra tamponada diluida 1:10 con una curva estándar de un compuesto de referencia con concentración conocida. Los diferentes coeficientes de extinción UV de la muestra y el compuesto de referencia se calcularon en función de las diferentes secuencias de aminoácidos y se consideraron en el cálculo de la concentración.

25

Los datos de solubilidad representativos se proporcionan en la Tabla 10 a continuación:

Tabla 10

30

Id. de sec. n.º	Solubilidad en tampón A [mg/ml]	Solubilidad en tampón B [mg/ml]	Solubilidad en tampón C [mg/ml]
2	-	>7,6	-
3	-	>8,8	-
4	-	>9,6	-
6	-	>8,5	>8,1
7	-	>8,9	-
10	-	-	>10,0
14	>9,1	-	>8,7

Id. de sec. n.º	Solubilidad en tampón A [mg/ml]	Solubilidad en tampón B [mg/ml]	Solubilidad en tampón C [mg/ml]
17	-	-	>10,7
18	>10,2	>9,3	-
19	>10,2	>10,8	5,7
20	>9,5	>9,1	6,8
23	-	-	9,1
24	-	-	>10,1
32	-	-	8,6
35	-	>8,7	>9,8
36	-	-	>9,7
39	-	-	10,3
43	-	-	>9,8
51	-	>8,8	>7,7
58	-	>9,5	>9,4
59	-	>9,4	>9,1
60	-	>11,5	>11,0
61	-	>10,6	>9,5
67	-	6,8	7,5
68	-	>9,8	>8,9
72	-	>10,7	-
75	-	>9,0	>7,9
77	-	>8,0	>9,0
79	-	18,9	>8,8
81	-	20,4	>9,6
99	>10,0	-	-
135	>8,4	>9,2	7,5
136	>8,4	>8,6	7,8
137	>8,6	>8,4	>8,7
138	>8,6	>8,7	8,2
139	>9,1	>8,6	>8,8
141	-	>8,3	-
142	-	>8,7	-
146	-	-	>8,8

Ejemplo 14: Evaluación de la estabilidad física mediante un ensayo de tioflavina T

La estabilidad física de los compuestos se evaluó mediante un ensayo de tioflavina T (ThT).

5 La baja estabilidad física de una solución de péptidos puede conducir a la formación de fibrillas de amiloide, que se observan como estructuras macromoleculares en forma de hilos bien ordenadas en la muestra, que eventualmente pueden conducir a la formación de gel. La ThT se usa ampliamente para visualizar y cuantificar la presencia de agregados de proteínas mal plegadas (véase Biancalana y col., *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, 1804(7), 1405). Cuando se une a fibrillas, como las de los agregados de amiloide, el tinte muestra una firma de fluorescencia distinta (véase Naiki y col., *Anal. Biochem.*, 1989, 177, 244; y LeVine y col., *Methods. Enzymol.*, 1999, 309, 274). El curso temporal de la formación de fibrillas a menudo sigue la forma característica de una curva sigmoidea y se puede separar en tres regiones: una fase de retraso, una fase de crecimiento rápido y una fase de meseta. El proceso típico de formación de fibrillas comienza con la fase de retraso en donde la cantidad de péptido parcialmente plegado convertido en fibrillas no es lo suficientemente significativa como para ser detectada. El tiempo de retraso corresponde al momento en que

10

15

se construye la masa crítica del núcleo. Posteriormente, sigue una fase de elongación drástica y la concentración de fibrillas aumenta rápidamente. Por lo tanto, midiendo el aumento en la intensidad de la fluorescencia atribuible a la ThT, así como el tiempo de retraso del aumento, se puede determinar la tendencia a la fibrilación de un péptido, proporcionando así una medida de la estabilidad física del péptido.

En el presente estudio, los compuestos de prueba se diluyeron en tampón hasta una concentración final de 3 mg/ml. Posteriormente, se añadieron 20 µl de una solución de ThT 10,1 mM en agua a 2 ml de solución de péptido para obtener una concentración final de 100 µM de ThT. Los experimentos se realizaron utilizando dos tampones: Tampón acetato 100 mM, pH 4,5 (Tampón A); y tampón acetato 100 mM, pH 4,5 y m-cresol 2,7 mg/ml (Tampón B).

Las tendencias a la fibrilación de los péptidos se determinaron bajo estrés utilizando un fluorómetro Fluoroskan Ascent FL o Fluoroskan Ascent. Se colocaron muestras de 200 µl en una placa de microtitulación PS de 96 pocillos, fondo plano, Greiner Fluotrac n.º 655076. Las placas se sellaron con cinta adhesiva (Quiagen). Las muestras se sometieron a estrés mediante ciclos continuos de 10 s de agitación a 960 rpm y un período de descanso de 50 s a 37 °C. El desarrollo de fibrillas se controló midiendo la intensidad de la fluorescencia cada 20 minutos. Para cada muestra, se probaron ocho réplicas.

Los datos de estabilidad representativos obtenidos en el Tampón A se proporcionan en la Tabla 11 a continuación, donde "IF" se refiere a la intensidad de la fluorescencia:

Tabla 11

Id. de sec. n.º	Aumento de IF	Tiempo de retraso [h]
4	Sí	18
6	No	>45
35	No	>45
60	No	>45
75	No	>45
141	No	>45
146	No	>45

Los datos de estabilidad representativos obtenidos en el Tampón B se proporcionan en la Tabla 12 a continuación:

Tabla 12

Id. de sec. n.º	Aumento de IF	Tiempo de retraso [h]
6	No	>45
7	No	>45
35	No	>45
60	No	>45
72	Sí	34,7-41,0
75	No	>45
77	Sí	23,0-29,7
83	No	>45
99	No	>45
130	No	>45
131	No	>45
132	No	>45
135	No	>45
141	No	>45
142	No	>45
146	No	>45

Ejemplo 15: Evaluación de la estabilidad física mediante un ensayo dinámico de dispersión de la luz

La estabilidad física de los compuestos también se evaluó mediante un ensayo de dispersión dinámica de la luz.

5 La dispersión dinámica de la luz (DLS) mide la luz dispersada por las partículas ($1 \text{ nm} \leq \text{radio} \leq 1 \text{ }\mu\text{m}$) que sufren movimiento browniano. Este movimiento es inducido por colisiones entre las partículas y las moléculas de disolvente, que a su vez se mueven debido a su energía térmica. El movimiento de difusión de las partículas da como resultado fluctuaciones temporales de la luz dispersada (Pecora, "Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy", Plenum Press, 1985). Las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersa se registran y se transforman en una función de autocorrelación. Ajustando la curva de autocorrelación a una función exponencial, se puede derivar el coeficiente de difusión D de las partículas en solución. A continuación, el coeficiente de difusión se utiliza para calcular el radio hidrodinámico R_h (o radio aparente de Stokes) mediante la ecuación de Stokes-Einstein asumiendo partículas esféricas. Este cálculo se define en la Norma Internacional ISO13321, Métodos para la determinación de la distribución del tamaño de partículas, Parte 8: Espectroscopía de correlación de fotones, Organización Internacional de Normalización (ISO) 1996; y la Norma Internacional ISO22412 Análisis del tamaño de partículas: dispersión dinámica de la luz, Organización Internacional de Normalización (ISO) 2008.

El parámetro de interacción DLS (k_D) es una medida para describir interacciones entre partículas, donde las partículas son proteínas o péptidos plegados (Yadav y col., J. Pharm. Sc. 2010, 99(3), 1152; y Connolly y col., Biophys. J. 2012, 103, 69). Los valores altos indican fuertes interacciones netas repulsivas, mientras que los valores bajos indican fuerzas netas atractivas. Por lo tanto k_D puede utilizarse con fines de comparación relativa y cualitativa.

En el presente estudio, la estabilidad física de los compuestos de prueba se evaluó determinando el radio hidrodinámico aparente (R_h), la intensidad de dispersión (I) y la contribución de masa (M) después de la síntesis (0 semanas) y después del almacenamiento durante 4 semanas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$.

La estabilidad de los compuestos se evaluó en cinco sistemas tampón diferentes: Tampón acetato 100 mM, pH 4,5 (Tampón A); Tampón acetato 100 mM, pH 4,5, 2,7 mg/ml de m-cresol (Tampón B); Tampón fosfato 20 mM, pH 6,2 (Tampón C); Tampón fosfato 20 mM, pH 7,4 (Tampón D); y tampón acetato 20 mM, pH 4,5 (Tampón E).

Para cada solución de compuesto experimental, el radio hidrodinámico R_h y la constante de difusión D (relacionada mediante la ecuación de Stokes-Einstein) se determinaron como un promedio de triplicados. Ambos parámetros se determinaron a diferentes concentraciones de compuestos (por ejemplo, R_{h1} y D_1 : 1 mg/ml y R_{h5} y D_5 : 5 mg/ml, R_{h10} y D_{10} : 10 mg/ml) en el mismo sistema tampón. La diferencia de estos parámetros entre la concentración baja y alta de péptidos es un sustituto del parámetro de interacción DLS k_D . Valores crecientes de D o valores decrecientes de R_h con una concentración creciente de péptidos corresponden a $k_D > 0$ y, por lo tanto, a interacciones repulsivas entre partículas que dan como resultado una estabilidad física (o coloidal) mejorada. Además, el radio hidrodinámico R_h y la correspondiente intensidad de dispersión (%) se determinaron como un promedio de duplicados. La concentración diana fue $300 \text{ }\mu\text{M}$. Por lo tanto, se prepararon soluciones de muestras sólidas en un sistema tampón con una concentración de compuesto de $300 \text{ }\mu\text{M}$ basándose en el % de pureza previamente determinado.

Las mediciones de DLS se realizaron en un lector de placas DynaPro I (Wyatt Technology, Santa Bárbara, CA, EE. UU.) con una fuente de luz láser de 837 nm en un ángulo de dispersión de 150° . Los datos se recopilaron y procesaron con el software Dynamics V 7.8.1.3 o 7.8.2.18 proporcionado por Wyatt Technology.

Los radios hidrodinámicos se determinaron con métodos de mínimos cuadrados restringidos no negativamente (NNLS) utilizando algoritmos DYNALS con ajuste de regularización. Por razones comparativas, se utilizaron el índice de refracción $n=1,330$ y $\eta=0,89 \text{ cP}$ de agua para todas las muestras. Las muestras se templaron durante 1 hora a $+25 \text{ }^\circ\text{C}$ y se inspeccionaron visualmente antes del análisis.

Las muestras se mezclaron con la ayuda de una punta de pipeta. Las mediciones se realizaron en 5 réplicas. Por lo tanto, se pipetearon 5 alícuotas de $15 \text{ }\mu\text{l}$ en la placa de ensayo de poliestireno 384 con fondo transparente (Greiner Bio-One, Alemania) y se sellaron. La placa se centrifugó durante 2 minutos a 600 rcf. Después de retirar el sellado, las muestras se midieron a $+25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Los datos de estabilidad representativos se proporcionan en la Tabla 13 a continuación:

Tabla 13

Id. de sec. n.º	R_h aparente [nm]		Intensidad de dispersión (I) [%]		Contribución de la masa (M) [%]		Tampón
	0 semanas	4 semanas	0 semanas	4 semanas	0 semanas	4 semanas	
36	$1,42 \pm 0,08$	$1,48 \pm 0,11$	88 ± 8	98 ± 2	$1,42 \pm 0,08$	$1,48 \pm 0,11$	A
59	$3,66 \pm 0,05$	$3,75 \pm 0,08$	100 ± 0	100 ± 0	$3,66 \pm 0,05$	$3,75 \pm 0,08$	C

Id. de sec. n.º	R _h aparente [nm]		Intensidad de dispersión (I) [%]		Contribución de la masa (M) [%]		Tampón
	0 semanas	4 semanas	0 semanas	4 semanas	0 semanas	4 semanas	
99	3,32 ± 0,18	3,42 ± 0,04	100 ± 1	99 ± 1	3,32 ± 0,18	3,42 ± 0,04	A
135	2,83 ± 0,12	3,01 ± 0,03	99 ± 1	99 ± 1	2,83 ± 0,12	3,01 ± 0,03	A
135	2,54 ± 0,16	2,63 ± 0,15	100 ± 0	100 ± 0	2,54 ± 0,16	2,63 ± 0,15	D
136	2,75 ± 0,14	2,70 ± 0,28	98 ± 3	97 ± 2	2,75 ± 0,14	2,70 ± 0,28	A
136	2,40 ± 0,15	2,48 ± 0,07	98 ± 3	98 ± 2	2,40 ± 0,15	2,48 ± 0,07	D
137	3,31 ± 0,15	3,34 ± 0,25	94 ± 1	100 ± 0	3,31 ± 0,15	3,34 ± 0,25	A
137	3,50 ± 0,03	3,60 ± 0,10	100 ± 0	100 ± 0	3,50 ± 0,03	3,60 ± 0,10	B
137	2,66 ± 0,13	2,65 ± 0,11	84 ± 6	88 ± 9	2,66 ± 0,13	2,65 ± 0,11	D
137	2,38 ± 0,13	2,59 ± 0,07	98 ± 2	100 ± 0	2,38 ± 0,13	2,59 ± 0,07	E
138	2,75 ± 0,19	2,82 ± 0,11	86 ± 4	84 ± 1	2,75 ± 0,19	2,82 ± 0,11	A
139	3,04 ± 0,08	3,13 ± 0,22	98 ± 1	95 ± 4	3,04 ± 0,08	3,13 ± 0,22	A
139	2,94 ± 0,32	3,11 ± 0,14	96 ± 5	93 ± 3	2,94 ± 0,32	3,11 ± 0,14	B
139	2,38 ± 0,23	2,56 ± 0,29	96 ± 3	100 ± 0	2,38 ± 0,23	2,56 ± 0,29	D
141	2,19 ± 0,18	2,34 ± 0,22	100 ± 1	98 ± 2	2,19 ± 0,18	2,34 ± 0,22	D
142	3,63 ± 0,14	3,59 ± 0,04	100 ± 0	100 ± 0	3,63 ± 0,14	3,59 ± 0,04	B

Ejemplo 16: Evaluación de las propiedades farmacocinéticas

5 Las propiedades farmacocinéticas de los péptidos ilustrativos de id. de sec. n.º 35 e id. de sec. n.º 24 se evaluaron en ratones y ratas.

10 El compuesto de prueba se administró en un sistema tampón adecuado (solución tampón PBS a pH 7,4 o solución DPBS) en concentraciones de 0,05, 0,1, 0,5 o 1 mg/ml dependiendo de la dosis, especie y volumen de administración. A ratones hembra C57Bl/6 y macho SD se les administró una dosis de 0,1 mg/kg o 0,3 mg/kg por vía intravenosa o subcutánea. Los animales se sacrificaron y se recogieron muestras de sangre después de 0,08, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 y 48 horas después de la administración intravenosa y 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 y 48 horas después de la administración subcutánea, respectivamente. Las muestras de plasma se analizaron después de la precipitación de proteínas mediante espectrometría de masas por cromatografía líquida (LC/MS). Los parámetros farmacocinéticos y la semivida se calcularon utilizando Phoenix-WinNonlin 8.1 utilizando un modelo no compartimental y un cálculo de interpolación trapezoidal lineal.

15 Los resultados de este estudio para estos péptidos se presentan en la Tabla 14 a continuación:

20 Tabla 14

Id. de sec. n.º	Especie	Tratamiento	T _{1/2} [h]	C _{máx} [ng/ml]	AUC _{último} [h*ng/ml]	Cl [L/h/kg]	F [%]
35	Ratón	0,3 mg/kg i.v.	6,4	4150	23700	0,0126	-
35	Ratón	0,1 mg/kg s.c.	5,5	1410	18500	-	-
35	Rata	0,1 mg/kg i.v.	3,0	1900	2790	0,0358	-
35	Rata	0,1 mg/kg s.c.	6,1	131	1200	-	45,8
24	Rata	0,1 mg/kg i.v.	4,81	1480	3790	0,0258	-
24	Rata	0,3 mg/kg s.c.	5,51	171	2610	-	24,0

Ejemplo 17: Evaluación del efecto sobre la presión arterial

25 El efecto de los compuestos sobre la presión arterial se determinó en estudios de telemetría en ratas Sprague Dawley a una dosis de 0,1 mg/kg SC.

A las ratas se les implantó previamente un dispositivo de telemetría (DSI, Saint-Paul, EE. UU., HD-S10, HD-S11 o HD S21) y se les permitió recuperarse durante un período mínimo de 2 semanas antes del tratamiento con el vehículo o los diferentes péptidos. La presión arterial (PA) se registró mediante un catéter insertado en la aorta abdominal. El

cuerpo del dispositivo se colocó en el abdomen. Al finalizar la cirugía, los animales fueron colocados en jaulas individuales hasta el final del estudio.

Las señales de presión se registraron durante una hora antes del tratamiento (período basal). Posteriormente, se realizó la administración subcutánea del compuesto de prueba o su vehículo, con registro continuo de la señal durante un período de 48 horas. La adquisición de datos se realizó utilizando el software de adquisición Hem 4.3 (Notocord®, Le Pecq, Francia) conectado al dispositivo de telemetría. Los parámetros hemodinámicos se registraron durante un período de 2 horas antes del tratamiento y cada período de 4 horas después de la administración subcutánea durante 48 horas.

Los parámetros investigados (calculados a partir de la señal de PA) fueron la frecuencia cardíaca (FC) en latidos por minuto (lpm), la presión arterial diastólica y sistólica (PAD) en mmHg y la presión arterial media (PAM) en mmHg.

Los datos de Hem se manipularon utilizando Microsoft Excel®. Para cada parámetro, se determinó un valor basal como el promedio calculado durante un período de 1 hora durante la secuencia de pretratamiento, y los valores posteriores al tratamiento se calcularon durante períodos de 4 horas ([0-4], [4-8], [8-12], [12-16], [16-20], [20-24], [24-28], [32-36], [36-40], [40-44] y [44-48] horas) que abarcan el período de 48 horas posterior a la administración.

Los datos representativos se presentan en la Tabla 15 a continuación, donde “n” representa el número de animales para los cuales se obtuvieron valores individuales y la “Duración” indica el último momento donde todavía se observó un efecto significativo sobre la PA: Tabla 15

Tabla 15

Compuesto	n	Efecto sobre la presión sistólica % de cambio desde el inicio		
		8h	24h	Duración (h)
Vehículo	29	1,3	1,0	-
Id. de sec. n.º 35	8	-14,1	-5,0	30
Id. de sec. n.º 130	4	-15,2	-9,9	30
Id. de sec. n.º 135	4	-8,8	-4,8	30
Id. de sec. n.º 137	4	-15,9	-6,5	28
Id. de sec. n.º 140	4	-19,9	-3,0	32
Id. de sec. n.º 142	4	-22,2	-6,5	30
Id. de sec. n.º 149	3	-11,5	-2,5	30
Id. de sec. n.º 151	3	-12,3	-3,8	28
Id. de sec. n.º 152	3	-8,6	-6,0	20
Id. de sec. n.º 141	5	-5,2	-4,2	24
Id. de sec. n.º 138	4	-6,1	-3,6	30

Ejemplo 18: Evaluación del efecto sobre la masa corporal y el contenido de grasa corporal

Se evaluó la capacidad del péptido de id. de sec. n.º 35 para reducir la masa corporal y el contenido de grasa corporal en ratones. Su eficacia se comparó con la de un compuesto de referencia, concretamente el compuesto del Ejemplo 4 del documento WO2018013803 (Alsina-Fernández; Eli Lilly and Company), denominado en la presente memoria “Compuesto A”.

Se alojaron en grupos ratones hembra C57BL/6N Crl en condiciones de vivero que incluían un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y una temperatura ambiente de 23 ± 1 °C. Todos los animales tuvieron libre acceso al agua y a la dieta (dieta alta en grasas ajustada por Ssniff: TD.97366, Soest, Alemania) durante 18 semanas antes de la intervención farmacológica (fase de administración). Después del período previo a la alimentación, los ratones se alojaron individualmente y se asignaron al azar según el peso corporal a grupos de tratamiento con n = 8, de modo que cada grupo tuviera un peso corporal medio similar. Al comienzo del estudio, los ratones tenían entre 25-26 semanas de edad y un peso corporal de 42-50 g. Los ratones fueron tratados cada dos días durante las últimas horas de la tarde antes de apagar las luces con una inyección subcutánea de 8 nmol/kg de los compuestos de prueba o su vehículo (solución salina tamponada con fosfato (PBS)). El peso corporal y la ingesta de alimentos se midieron diariamente durante la fase de administración, mientras que el contenido de grasa corporal se midió el día 0 antes del inicio del tratamiento y el día 15. El estudio finalizó el día 15.

Para los análisis estadísticos se realizó un análisis de la varianza unidireccional (ANOVA) con SigmaStat 3.5. La prueba se realizó con un riesgo alfa de 0,050 y se realizó una comparación con el grupo de dieta alta en grasas-vehículo con las pruebas de Dunnett.

5 Los resultados de este estudio se presentan en las Figuras 1 y 2. Puede verse en la Figura 1 que la primera administración de id. de sec. n.º 35 y el Compuesto A provocó una reducción significativa de la ingesta de alimentos que se normalizó después del segundo tratamiento, paralelamente a los ratones tratados con vehículo. El peso corporal se redujo significativamente después de un período de tratamiento de 15 días en ratones tratados con id. de sec. n.º 35 o Compuesto A en comparación con el control del vehículo ($P < 0,001$). Los ratones tratados con vehículo
10 tuvieron un peso corporal casi constante durante los 15 días ($-1,9 \pm 1,6$ % durante las dos semanas), mientras que los ratones tratados con id. de sec. n.º 35 perdieron $-10,8 \pm 1,4$ % de peso corporal y los ratones tratados con el Compuesto A perdieron $-7,1 \pm 1,3$ % (véase Figura 2). La reducción del peso corporal corresponde a una reducción significativa del contenido de grasa corporal: $-34,2 \pm 2,9$ % para la id. de sec. n.º 35 y $-27,5 \pm 1,9$ % para el Compuesto A. Además, cuando se comparó en el mismo estudio con semaglutida administrada por vía subcutánea a 10 nmol/kg cada dos días, la id. de sec. n.º 35 redujo la obesidad en un grado similar pero con una menor incidencia en la ingesta de alimentos (ingesta de alimentos acumulada en 15 días: $39,3 \pm 2,5$ g para la id. de sec. n.º 35 y $29,6 \pm 0,9$ g para semaglutida frente a $43,7 \pm 1,3$ g para el vehículo) y con una mejor conservación de la masa magra: $-6,3 \pm 1,7$ % para la id. de sec. n.º 35 y $-14,8 \pm 0,7$ % para semaglutida frente a $-8,6 \pm 1,1$ % para el vehículo.

20 Ejemplo 19: Modificaciones de los ácidos grasos

El efecto de las modificaciones de los ácidos grasos se ha evaluado para aquellos péptidos de la Tabla 2 divulgados en la presente memoria que tienen una CE_{50} en hCRF2 $< 0,2$ nM, un perfil de selectividad hCRF1/hCRF2 > 500 y la ausencia de déficits metabólicos y químicos conocidos. Las secuencias preferenciales presentan la presencia de una D-valina en la posición 7 y, preferiblemente, aminoácidos voluminosos que flanquean N31.
25

Se seleccionaron diez secuencias optimizadas, que tenían el perfil mencionado anteriormente, de la lista de la Tabla 2 y se muestran en la Figura 3. Para dichos péptidos se sintetizaron los siguientes péptidos adicionales (Tabla 16). Estos compuestos comparten las mismas secuencias de aminoácidos que los compuestos divulgados anteriormente en la solicitud de patente de la Figura 3, pero difieren en la derivatización del conector/ácido graso. En la Tabla 16 a continuación, para cada compuesto recientemente propuesto también se indica el n.º de id. de sec. original de la solicitud de patente presentada, con la que comparten la misma secuencia de aminoácidos.
30

35 Síntesis de péptidos: Materiales y métodos

Se emplearon los siguientes materiales de partida y métodos en los procedimientos sintéticos descritos en los ejemplos. Se utilizó resina Rink Amida AM LL $0,29$ mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo, Novabiochem), malla 100-200 para la síntesis de todas las amidas peptídicas. Los aminoácidos naturales protegidos con Fmoc se adquirieron en Novabiochem, Iris Biotech, Bachem o Chem-Impex International. En la síntesis se utilizaron los siguientes aminoácidos convencionales: Fmoc-L-Ala-OH, Fmoc-L-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-L-Asn(Trt)-OH, Fmoc-L-Asp(OMpe)-OH, Fmoc-L-Gln(Trt)-OH, Fmoc-L-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-L-Gly-OH, Fmoc-L-Ile-OH, Fmoc-L-Leu-OH, Fmoc-L-Lys(Boc)-OH, Fmoc-L-Pro-OH, Fmoc-L-Ser(tBu)-OH, Fmoc-L-Thr(tBu)-OH, Fmoc-L-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-L-Val-OH.
40

Además, los siguientes aminoácidos se adquirieron en los mismos proveedores que antes: Fmoc-L-Lys(Dde)-OH, Fmoc-Aib-OH, Fmoc-D-Val-OH.
45

Tabla 16

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	Misma secuencia AA del antiguo id. de sec. n.º	R ^a
187	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQREQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 130	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
188	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQRQQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 135	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
189	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKAibRQKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 136	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
190	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKQREQAeKNKQILEQV-NH2	Id. de sec. 137	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
191	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKQREKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 138	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
192	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKQRQQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 139	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
193	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH2	Id. de sec. 83	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
194	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 147	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
195	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibRQQAETNKRILERV-NH2	Id. de sec. 150	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH

Id. de sec. n.º	Secuencia de aminoácidos	Misma secuencia AA del antiguo id. de sec. n.º	R ^a
196	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAeKNKRILERV-NH2	Id. de sec. 151	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
197	IVLSLDvPIKlK*QILLKQARQKAibQRAQAeKNKRILERV-NH2	Id. de sec. 174	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
198	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQREQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 130	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
199	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQREQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 130	-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
200	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKAibRQKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 136	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
201	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKAibRQKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 136	-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
202	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 147	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
203	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 147	-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
204	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQREQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 130	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
205	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQREQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 130	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
206	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQREQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 130	-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
207	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKRILERV-NH2	Id. de sec. 83	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
208	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKAibQRQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 135	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
209	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKAibRQKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 136	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
210	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKAibRQKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 136	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
211	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKKAibRQKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 136	-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
212	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKQREQAeKNKQILEQV-NH2	Id. de sec. 137	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
213	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKQREKAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 138	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
214	IVLSLDvPIKlK*QILLKQERQKQRRQAeKNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 139	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
215	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 147	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
216	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 147	-{AEEA} ₂ -gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
217	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAETNKQILAQV-NH2	Id. de sec. 147	-{AEEA} ₂ -{gGlu} ₂ -C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
218	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibREQAeKNKRILERV-NH2	Id. de sec. 151	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
219	IVLSLDvPIKlK*QILLKQARQKAibQRAQAeKNKRILERV-NH2	Id. de sec. 174	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
220	IVLSLDvPIGLK*QILLKQERQKKAibRQQAETNKRILERV-NH2	Id. de sec. 150	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
221	IVLSLDvPTKlK*QKLLKQERQRKEREQAeKNRILARV-NH2	Id. de sec. 7	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
222	IVLSLDvPTKlK*QKLLKQERQRKEREQAeKNRILERV-NH2	Id. de sec. 32	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH

Síntesis de péptidos: Materiales y métodos - continuación

5 Los siguientes elementos estructurales de la cadena lateral se adquirieron en Iris Biotech, TCI, Merck: Fmoc-AEEA-OH, Fmoc-L-Glu-OtBu, ácido palmítico (HO-C(O)(CH₂)₁₄CH₃), ácido hexadecanodioico (HO-C(O)(CH₂)₁₄COOH).

10 Los péptidos brutos se purificaron en un sistema HPLC preparativo Waters con una columna C4. En concreto se utilizó la siguiente columna: Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 µm. Como eluyentes se emplearon acetonitrilo + TFA 0,1 % y agua + TFA 0,1 %. Las fracciones que contenían el producto se recogieron y liofilizaron para obtener el producto purificado, normalmente como una sal de TFA.

Como alternativa, los compuestos se aislaron como sales de acetato mediante el siguiente procedimiento. El intercambio iónico se realizó utilizando una columna HiTrap™ Q HP (GE Healthcare). Los péptidos puros se disolvieron en una solución de ácido acético 0,16 M a 2 mg/ml, se cargaron lentamente en la columna y se eluyeron con una solución de ácido acético 0,16 M. La solución recogida se liofilizó.

5 Los péptidos brutos y purificados se analizaron mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución con detección UV y espectrometría de masas (UPLC-UV-MS). La UPLC analítica se realizó según uno de los siguientes métodos:

Método A:

10 Detección a 214 nm

Columna: Acquity Waters BEH130 C4, 1,7 µm (2,1 x 100 mm) a 45 °C

15 Disolvente: H₂O+TFA 0,1 % : ACN+TFA 0,1 % (flujo 0,4 ml/min)

Gradiente: 70:30 (0 min) a 70:30 (1 min) a 50:50 (5 min) a 10:90 (5,2 min) a 10:90 (5,5 min) a 70:30 (5,7 min) a 70:30 (6 minutos)

20 Analizador de masas: Detector Waters SQ con ionización por electropulverización en modo de detección de iones positivos

Método B:

25 Detección a 214 nm

Columna: Acquity Waters BEH130 C4, 1,7 µm (2,1 x 100 mm) a 45 °C

Disolvente: H₂O+ TFA 0,1 % : ACN+TFA 0,1 % (flujo 0,4 ml/min)

30 Gradiente: 65:35 (0 min) a 65:35 (1 min) a 45:55 (5 min) a 10:90 (5,2 min) a 10:90 (5,5 min) a 65:35 (5,7 min) a 65:35 (6 minutos)

35 Analizador de masas: Detector Waters SQ con ionización por electropulverización en modo de detección de iones positivos

Ejemplo 19.1: Procedimiento general de síntesis id. de sec. n.º 187-222

40 La síntesis de todos los péptidos (Id. de sec. n.º 187-222) se realizó mediante síntesis en fase sólida por etapas (SPPS) Fmoc estándar en un sintetizador de microondas Liberty Blue (CEM corp.). El ensamblaje se realizó utilizando una resina Rink amida AM LL 0,29 mmol/g en una escala de 0,1 mmol, con activación DIC/Oxyma. Se utilizó DMF como disolvente. Para la cadena lateral de lisina modificada, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en la posición 12.

Se emplearon las siguientes condiciones:

45 Desprotección estándar: Piperidina 20 % en DMF durante 2 x 120 s, 90 °C

Lavados: 4 x DMF.

50 Acoplamiento simple estándar: 5 eq. AA 0,4 M / 5 eq. DIC 1M/5 eq. Oxyma 1M, 120 s, 90 °C

Lavados: 4 x DMF.

55 Al final del ensamblaje, el extremo N del péptido se protegió usando carbonato de terc-butoxicarbonilo (exceso de 10 equivalentes con respecto a la carga de resina, FluoroChem) en DMF; la mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser.

60 La eliminación del grupo Dde en Lys12 se logró dejando gotear monohidrato de hidrazina al 2 % y lavando las resinas con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada una).

Después de la eliminación del grupo Dde, las resinas se trataron como se indica en los Ejemplos 2-7 según la derivatización de la cadena lateral de la secuencia peptídica.

65 La escisión de los péptidos de la resina se realizó usando el siguiente cóctel de escisión: 87,5 % TFA, 5 % fenol, 5 % agua, 2,5 % TIPS durante 2 a 2,5 horas. La resina empleada en la síntesis fue tal que el C-terminal se escindió de la resina como una amida primaria.

La mezcla de escisión se recogió por filtración, los péptidos brutos precipitaron en metil terc-butil éter, se centrifugó, se eliminó el sobrenadante, se añadió éter dietílico nuevo a los péptidos y se volvió a centrifugar dos veces; a continuación se liofilizaron los péptidos brutos.

Los péptidos se analizaron mediante UPLC analítica y se verificaron mediante espectrometría de masas ESI⁺. Los péptidos brutos se purificaron mediante un procedimiento de purificación por RP-HPLC preparativa estándar.

Ejemplo 19.2: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 187

El compuesto de id. de sec. n.º 186 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.1. Se utilizó una resina AM de amida Rink LL de Novabiochem de 0,29 mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo), malla 100-200. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación DIC/Oxyma. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida.

Al final del ensamblaje, se protegió el extremo N del péptido y se eliminó el grupo protector Dde en Lys12 como se describe en el Ejemplo 19.1.

El extremo γ -carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo épsilon-amino de Lys usando un Fmoc-L-Glu-OtBu con método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se eliminó tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con NMP/DCM/NMP (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

La unión de la fracción de unión a albúmina se realizó utilizando ácido hexadecanodioico ($\text{HO-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$) con método DIC/HOAt (exceso de 5 equivalentes respecto a la carga de resina) en NMP. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con NMP/DCM/NMP (6/6/6 veces cada uno).

El péptido se escindió de la resina como se describe en el Ejemplo 19.1. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 μm usando un gradiente de acetonitrilo/agua (con TFA al 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LC/MS (Método A). La señal de masa ($M/4+H$)⁺ observada debajo del pico con tiempo de retención de 3,84 min reveló la masa del péptido 1213,97 que concuerda con el valor esperado de 1213,47.

Ejemplo 19.3: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 198

El compuesto de id. de sec. n.º 197 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.1. Se utilizó una resina AM de amida Rink LL de Novabiochem de 0,29 mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo), malla 100-200. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación DIC/Oxyma. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida.

Al final del ensamblaje, se protegió el extremo N del péptido y se eliminó el grupo protector Dde en Lys12 como se describe en el Ejemplo 19.1.

Se unió Fmoc-AEEA-OH al grupo épsilon-amino de Lys con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc en AEEA se eliminó tratando la resina dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

Se unió un segundo Fmoc-AEEA-OH al grupo amino desprotegido con el método DIC/HOAt en DMF y luego se desprotegió de Fmoc como se ha descrito anteriormente.

El extremo γ -carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo amino desprotegido usando un Fmoc-L-Glu-OtBu con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se eliminó tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con NMP/DCM/NMP (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

La unión de la fracción de unión a albúmina se realizó utilizando ácido hexadecanodioico ($\text{HO-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$) con método DIC/HOAt (exceso de 5 equivalentes respecto a la carga de resina) en NMP. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con NMP/DCM/NMP (6/6/6 veces cada uno).

5 El péptido se escindió de la resina como se describe en el Ejemplo 19.1. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 µm usando un gradiente de acetonitrilo/agua (con TFA al 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LC/MS (Método A). La señal de masa ($M/4+H$)⁺ observada debajo del pico con tiempo de retención de 3,66 min reveló la masa del péptido 1286,7 que
10 concuerda con el valor esperado de 1286,05.

Ejemplo 19.4: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 199

15 El compuesto de id. de sec. n.º 198 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.1. Se utilizó una resina AM de amida Rink LL de Novabiochem de 0,29 mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo), malla 100-200. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación DIC/Oxyma. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida.

20 Al final del ensamblaje, se protegió el extremo N del péptido y se eliminó el grupo protector Dde en Lys12 como se describe en el Ejemplo 19.1.

25 Se unió Fmoc-AEEA-OH al grupo épsilon-amino de Lys con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc en AEEA se eliminó tratando la resina dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

30 Se unió un segundo Fmoc-AEEA-OH al grupo amino desprotegido con el método DIC/HOAt en DMF y luego se desprotegió de Fmoc como se ha descrito anteriormente.

35 El extremo γ-carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo amino desprotegido usando un Fmoc-L-Glu-OtBu con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se eliminó tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

40 Se unió un segundo Fmoc-L-Glu-OtBu al grupo amino desprotegido con el método DIC/HOAt en DMF y luego se desprotegió de Fmoc como se ha descrito anteriormente. La resina se lavó con NMP/DCM/NMP (6/6/6 veces cada uno).

45 La unión de la fracción de unión a albúmina se realizó utilizando ácido hexadecanodioico ($\text{HO-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{COOH}$) con método DIC/HOAt (exceso de 5 equivalentes respecto a la carga de resina) en NMP. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con NMP/DCM/NMP (6/6/6 veces cada uno).

50 El péptido se escindió de la resina como se describe en el Ejemplo 19.1. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 µm usando un gradiente de acetonitrilo/agua (con TFA al 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LC/MS (Método A). La señal de masa ($M/4+H$)⁺ observada debajo del pico con tiempo de retención de 3,50 min reveló la masa del péptido 1318,70 que concuerda con el valor esperado de 1318,33.

55 Ejemplo 19.5: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 204

60 El compuesto de id. de sec. n.º 203 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.1. Se utilizó una resina AM de amida Rink LL de Novabiochem de 0,29 mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo), malla 100-200. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación DIC/Oxyma. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida.

Al final del ensamblaje, se protegió el extremo N del péptido y se eliminó el grupo protector Dde en Lys12 como se describe en el Ejemplo 19.1.

65 El extremo γ-carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo épsilon-amino de Lys usando un Fmoc-L-Glu-OtBu con método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a

temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se eliminó tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

La unión de la fracción de unión a albúmina se realizó utilizando ácido palmítico ($\text{HO-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$) con método DIC/HOAt (exceso de 5 equivalentes respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno).

El péptido se escindió de la resina como se describe en el Ejemplo 19.1. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 µm usando un gradiente de acetonitrilo/agua (con TFA al 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LC/MS (Método B). La señal de masa (M/4+H)⁺ observada debajo del pico con tiempo de retención de 3,84 min reveló la masa del péptido 1206,50 que concuerda con el valor esperado de 1205,98.

Ejemplo 19.6: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 205

El compuesto de id. de sec. n.º 204 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. Se utilizó una resina AM de amida Rink LL de Novabiochem de 0,29 mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo), malla 100-200. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación DIC/Oxyma. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida.

Al final del ensamblaje, se protegió el extremo N del péptido y se eliminó el grupo protector Dde en Lys12 como se describe en el Ejemplo 19.1.

Se unió Fmoc-AEEA-OH al grupo épsilon-amino de Lys con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc en AEEA se eliminó tratando la resina dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

Se unió un segundo Fmoc-AEEA-OH al grupo amino desprotegido con el método DIC/HOAt en DMF y luego se desprotegió de Fmoc como se ha descrito anteriormente.

El extremo γ-carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo épsilon-amino de Lys usando un Fmoc-L-Glu-OtBu con método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se eliminó tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

La unión de la fracción de unión a albúmina se realizó utilizando ácido palmítico ($\text{HO-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$) con método DIC/HOAt (exceso de 5 equivalentes respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno).

El péptido se escindió de la resina como se describe en el Ejemplo 19.1. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 µm usando un gradiente de acetonitrilo/agua (con TFA al 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LC/MS (Método B). La señal de masa (M/4+H)⁺ observada debajo del pico con tiempo de retención de 3,45 min reveló la masa del péptido 1279,0 que concuerda con el valor esperado de 1278,56.

Ejemplo 19.7: Síntesis del péptido de id. de sec. n.º 206

El compuesto de id. de sec. n.º 205 se preparó siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 19.1. Se utilizó una resina AM de amida Rink LL de Novabiochem de 0,29 mmol/g (resina 4-(2',4'-dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoxiacetamido-norleucilaminometilo), malla 100-200. La estrategia de síntesis automatizada de Fmoc se aplicó con activación DIC/Oxyma. En la posición 12, se usó Fmoc-L-Lys(Dde)-OH en el protocolo de síntesis en fase sólida.

Al final del ensamblaje, se protegió el extremo N del péptido y se eliminó el grupo protector Dde en Lys12 como se describe en el Ejemplo 19.1.

Se unió Fmoc-AEEA-OH al grupo épsilon-amino de Lys con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc en AEEA se eliminó tratando la resina dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

Se unió un segundo Fmoc-AEEA-OH al grupo amino desprotegido con el método DIC/HOAt en DMF y luego se desprotegió de Fmoc como se ha descrito anteriormente.

El extremo γ -carboxilo del ácido glutámico se unió al grupo amino desprotegido usando un Fmoc-L-Glu-OtBu con el método DIC/HOAt (exceso de 4 equivalentes con respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). El grupo Fmoc del ácido glutámico se eliminó tratándolo dos veces con una solución de piperidina/DMF al 20 % (v/v) durante 5 minutos (25 ml cada uno). La resina se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno). Una prueba de Kaiser en una alícuota de resina peptídica una vez completada la desprotección de Fmoc fue positiva.

Se unió un segundo Fmoc-L-Glu-OtBu al grupo amino desprotegido con el método DIC/HOAt en DMF y luego se desprotegió de Fmoc como se ha descrito anteriormente.

La unión de la fracción de unión a albúmina se realizó utilizando ácido palmítico ($\text{HO-C(O)(CH}_2\text{)}_{14}\text{CH}_3$) con método DIC/HOAt (exceso de 5 equivalentes respecto a la carga de resina) en DMF. La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 1 h y la reacción se controló mediante la prueba de Kaiser. La resina se filtró y se lavó con DMF/DCM/DMF (6/6/6 veces cada uno).

El péptido se escindió de la resina como se describe en el Ejemplo 19.1. El producto bruto se purificó mediante RP-HPLC preparativa en una Reprosil Gold C4 Prep (Dr Maisch), 250 x 40 cm, 120 Å, 5 μm usando un gradiente de acetonitrilo/agua (con TFA al 0,1 %). El péptido purificado se analizó mediante LC/MS (Método B). La señal de masa ($M/4+H$)⁺ observada debajo del pico con tiempo de retención de 3,30 min reveló la masa del péptido 1311,35 que concuerda con el valor esperado de 1310,83.

Ejemplo 19.8: Síntesis de otros péptidos

Los siguientes péptidos se sintetizaron siguiendo los procedimientos descritos en los Ejemplos 19.1-7. Las masas calculadas y observadas y los tiempos de retención de estos péptidos se indican en la Tabla 3 a continuación, junto con los de los compuestos de los Ejemplos 19.2-7:

Tabla 17

Id. de sec. n.º	Masa calc. (M/4+H) ⁺	Masa observada (M/4+H) ⁺	Tiempo de retención (min)	Método
187	1213,47	1213,97	3,84	A
188	1213,23	1213,69	3,82	A
189	1213,25	1213,60	3,61	A
190	1238,75	1239,24	3,71	A
191	1224,25	1224,70	3,63	A
192	1223,99	1224,54	3,7	A
193	1217,47	1217,89	3,99	A
194	1188,93	1189,40	4,08	A
195	1217,23	1217,70	3,91	A
196	1224,24	1224,70	3,87	A
197	1212,99	1213,4	3,89	A
198	1286,05	1286,7	3,66	A
199	1318,33	1318,7	3,50	A
200	1285,83	1286,4	3,49	A
201	1318,11	1318,6	3,35	A
202	1261,51	1261,9	3,87	A

Id. de sec. n.º	Masa calc. (M/4+H)+	Masa observada (M/4+H)+	Tiempo de retención (min)	Método
203	1293,79	1294,2	3,74	A
204	1205,98	1206,5	3,67	B
205	1278,56	1279,0	3,45	B
206	1310,83	1311,35	3,30	B
207	1209,98	1210,5	3,87	B
208	1205,73	1206,3	3,63	B
209	1205,75	1206,3	3,44	B
210	1278,33	1278,87	3,22	B
211	1310,61	1311,07	3,12	B
212	1231,25	1231,8	3,52	B
213	1216,75	1217,2	3,51	B
214	1216,50	1217,0	3,52	B
215	1181,44	1181,9	3,98	B
216	1254,02	1254,5	3,76	B
217	1286,30	1286,8	3,62	B
218	1216,74	1217,3	3,76	B
219	1205,50	1205,9	3,63	B
220	1209,73	1210,3	3,82	B
221	1231,98	1232,2	3,09	A
222	1253,51	1253,9	3,11	A

Abreviaturas

Se utilizan ciertas abreviaturas en los ejemplos y en otros lugares de la presente memoria:

5

“AA” se refiere a aminoácido;

“AEEA” se refiere a [2-(2-aminoetoxi)etoxi]acetilo;

10

“Aib” se refiere a ácido 2-amino-isobutírico;

“Boc” se refiere a terc-butiloxicarbonilo;

“tBu” se refiere a butilo terciario;

15

“DCM” se refiere a diclorometano;

“Dde” se refiere a 1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-etilo;

20

“DIC” se refiere a N,N'-diisopropilcarbodiimida;

“DMF” se refiere a dimetilformamida;

“Fmoc” se refiere a fluorenilmetiloxicarbonilo;

25

“gGlu” se refiere a gamma-glutamato (γ E);

“HOAt” se refiere a 1-hidroxi-7-azabenzotriazol;

30

“HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alta resolución;

“LC/MS” se refiere a cromatografía líquida/espectrometría de masas;

“MS” se refiere a espectrometría de masas;

“NMP” se refiere a N-Metil-2-pirrolidona;

“OtBu” se refiere a O-terc-butilo;

“Oxyrna” se refiere a cianohidroxiiminoacetato de etilo;

“Pbf” se refiere a 2,2,4,6,7-pentametildihidrobencofuran-5-sulfonilo;

“RP-HPLC” se refiere a cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa;

“TIPS” se refiere a triisopropilsilano;

“TFA” se refiere a ácido trifluoroacético;

“Trt” se refiere a tritilo.

Ejemplo 19.9: Evaluación de la actividad en el receptor CRF2 α humano de estos péptidos modificados por FA

El agonismo de los compuestos para el factor 2 α liberador de corticotropina humana (receptor CRF2 α) se determinó mediante un ensayo funcional que mide la modulación de AMPc tras el tratamiento de células TeloHEAC que expresan de forma estable el receptor CRF2 α humano.

Los compuestos se disolvieron a 0,5 mM en DMSO al 100 % y se diluyeron en serie (1:2) en DMSO al 100 % durante 16 diluciones. A continuación, se transfirieron 20 nl de cada dilución a una placa de ensayo de 384 pocillos utilizando un instrumento acústico de eyección de gotitas. A continuación, 5 μ l de tampón compuesto (1x HBSS; HEPES 20 mM, IBMX 2 mM, HSA al 0 % o al 0,2 %) se añadieron a cada pocillo.

Antes de su uso, las células congeladas se descongelaron rápidamente a 37 °C y se lavaron (5 min a 900 rpm) con 20 ml de tampón celular (1x HBSS; HEPES 20 mM). Las células se resuspendieron en tampón celular y se ajustaron a una densidad celular de 800.000 células/ml.

Se dispensaron 5 μ l de células (densidad Dell final: 4000 células/pocillo) en la placa de ensayo de 384 pocillos que contenía el compuesto y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C.

El nivel de AMPc en las células tratadas se determinó utilizando el kit Cisbio 62AM4PEC según las instrucciones del fabricante. Finalmente, las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente antes de medir la relación de fluorescencia entre 665/620 nm.

El valor porcentual de actividad (E%) se calculó estableciendo 100 nM de urocortina 2 (UCN2) como 100 %. La potencia in vitro de los compuestos se cuantificó determinando las concentraciones que causaron una activación del 50 % de la respuesta máxima (CE50) respecto a la urocortina 2.

Los valores representativos de la CE50 se proporcionan en la **Tabla 18** a continuación:

Tabla 18

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA
187	0,44
188	0,46
189	3,49
190	2,47
191	2,68
192	0,83
193	0,82
194	0,11
195	0,34
196	1,08
197	2,27

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM], 0 % de HSA
198	0,49
199	1,39
200	8,70
201	4,66
202	0,87
203	4,70
204	0,14
205	0,32
206	0,09
207	0,68
208	0,90
209	8,62
210	2,98
211	0,94
212	1,23
213	4,48
214	4,15
215	0,15
216	0,19
217	0,16
218	1,58
219	5,98
220	1,48
221	2,71
222	7,38

Ejemplo 19.10: Evaluación de la actividad en el receptor CRF1R anti-diana de los compuestos según la invención

Se adquirió en PerkinElmer el clon 2 de la línea celular CHO-K1 con sobreexpresión de CRF1R.

5 Las células se cultivaron en una placa de 10 cm a 37 °C/5 % de CO₂ en medio (F12 (Hams)/FBS 10 %/400 µg/ml de G418) hasta casi la confluencia. En esa etapa, las células se recogieron y se resuspendieron a 10 millones/ml en medio de cultivo sin G418 y con DMSO al 10 %. Se congelaron lentamente alícuotas de viales de 1 ml a -80 °C en isopropanol y luego se transfirieron a nitrógeno líquido para su almacenamiento. Estos viales se utilizaron para realizar el experimento siguiendo el procedimiento descrito en el párrafo anterior, excepto el compuesto utilizado en el pocillo de control para definir el 100 % de activación (Sauvagina a 100 nM)

Los valores representativos de CE50 y Emáx se proporcionan en la Tabla 19 a continuación:

15 Tabla 19

Id. de sec. n.º	CE50 [nM] 0 % de HSA	Emáx (%)
16	>100	0,4
22	>100	1,2
25	>100	0,1
26	>100	0,6
27	>100	34,2

ES 2 988 026 T3

Id. de sec. n.º	CE50 [nM] 0 % de HSA	Emax (%)
28	>100	8,4
29	>100	18,4
30	>100	14,5
88	>100	2,3
89	>100	3,7
96	>100	2,3
102	>100	9,0
103	>100	14,0
104	>100	3,7
105	>100	15,4
106	>100	5,1
108	>100	-2,0
109	>100	1,1
110	>100	5,4
116	>100	0,8
117	>100	-6,0
118	>100	1,5
119	>100	0,4
121	>100	-1,1
122	>100	6,9
123	>100	9,0
124	>100	-2,5
125	>100	17,7
126	>100	36,5
134	>100	-8,6
148	>100	2,6
149	>100	6,6
150	>100	7,2
152	>100	4,9
156	>100	4,0
187	>100	43,79
189	>100	14,97
190	>100	11,96
191	>100	12,51
193	>100	8,77
194	>100	21,63
195	>100	17,15
196	>100	16,95
197	>100	24,40
198	>100	1,40
199	>100	-2,90
200	>100	1,90

Id. de sec. n.º	CE50 [nM] 0 % de HSA	Emax (%)
201	>100	-2,80
202	>100	5,40
203	>100	4,70
221	>100	3,20
222	>100	6,20
223	82,81	57,3
224	>100	52,59
225	24,2	58,92
226	96,2	83,98

5 En esta tabla es notable un efecto aparente sobre la presencia de un ácido carboxílico libre en la modificación por FA de K12. Véase, por ejemplo, cómo los péptidos 223, 225 y 226 comprenden la fracción de unión a albúmina -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄CH₃, en comparación con, por ejemplo, los péptidos 222 y 224, que comprenden como fracciones de unión a albúmina respectivamente -gGlu-C(O)(CH₂)₁₄COOH y -{AEEA}₂-gGlu-C(O)(CH₂)₁₈COOH. Esto es aún más evidente para la comparación directa (Tabla 20) de péptidos que sólo difieren entre sí por la presencia de dicho ácido carboxílico libre.

Id. de sec.	CRF2 CE 50	CRF1 CE 50	Relación CRF1/CRF2	Id. de sec. de péptido	RA
219	5,98	13,48	2	174	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
197	2,27	>100	>500	174	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
208	0,9	1,43	2	135	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
188	0,46	69,09	134	135	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
214	4,15	4,27	1	139	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
192	0,83	56,56	68	139	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
212	1,23	0,9	1	137	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
190	2,47	>100	>500	137	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
218	1,58	6,97	4	151	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
196	1,08	>100	>500	151	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
207	0,68	4,18	6	83	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
193	0,82	>100	>500	83	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
220	1,48	8,91	6	150	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
195	0,34	>100	>500	150	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
209	8,62	21,73	3	136	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
189	3,49	>100	>500	136	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH
204	0,14	0,44	3	130	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ CH ₃
187	0,44	>100	>500	130	-gGlu-C(O)(CH ₂) ₁₄ COOH

10 Tabla 20

También se ha observado (datos no mostrados) que extender el conector, tal como -{AEEA}₂-gGlu- y -{AEEA}₂-(gGlu)₂- de dichas fracciones de unión a albúmina, que comprenden un ácido carboxílico libre, mejora aún más la selectividad por CRF2 de los péptidos.

15 Ejemplo 19.11: Protocolos DMPK y resultados de estos péptidos modificados con FA Estabilidad plasmática *in vitro*

La estabilidad metabólica plasmática *in vitro* se estudió en ratas Sprague Dawley macho y en humanos. Los compuestos de prueba se incubaron a 3 mM durante 2 horas a 37 °C. En cada punto temporal (0, 0,25, 1 y 2 h), se prepararon muestras para el análisis mediante una técnica de precipitación de proteínas de una sola etapa agregando 150 µl de etanol y ácido fórmico al 0,1 % a alícuotas de 50 µl de plasma. Las muestras se mezclaron mediante vórtex para lograr homogeneidad y luego se sometieron a centrifugación a 14000 rpm durante 15 min. Se recogió el sobrenadante (100 µl), se diluyó con 100 µl de agua y ácido fórmico al 0,1 % y se analizó mediante LC-HRMS (TripleTOF 6600+, AB Sciex). Para cada compuesto de prueba, las proporciones de área en cada momento se compararon con la proporción de área de 0 h y se convirtieron a un porcentaje restante.

Se proporcionan datos representativos de estabilidad del plasma en la **Tabla 21** a continuación:

Tabla 21

Id. de sec.	Especie	% restante a las 2 horas
187	Ser humano	97
	Rata	102
188	Ser humano	106
	Rata	92
189	Ser humano	97
	Rata	101
190	Ser humano	100
	Rata	92
191	Ser humano	96
	Rata	85
192	Ser humano	95
	Rata	109
193	Ser humano	80
	Rata	84
194	Ser humano	101
	Rata	85

5 Solubilidad y estabilidad química

Como en el Ejemplo 15 anterior, también se ha evaluado la estabilidad química de ejemplos representativos de estos péptidos modificados con FA, utilizando LC-UV en lugar de dispersión de la luz. La solubilidad y la estabilidad química se estudiaron en tampón fosfato 100 mM (pH 7,4) y tampón acetato 100 mM (pH 4,5). Los polvos del compuesto de prueba se disolvieron en ambos tampones a una concentración diana de 10 mg/ml y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la centrifugación a 2500 rcf durante 15 minutos, se diluyeron 10 ml de sobrenadante con 190 ml del tampón de incubación y se analizaron mediante LC-UV (Acquity UPLC-DAD, Waters). La solubilidad se calculó comparando el área del pico del compuesto experimental en la muestra amortiguadora con el área del pico del mismo compuesto disuelto a 0,5 mg/ml en agua: acetonitrilo 1:1, ácido fórmico al 0,1 %.

Del sobrenadante centrifugado, se recogieron dos alícuotas adicionales de 80 ml y se diluyeron con 160 ml de tampón de incubación. Una alícuota se almacenó a 5 °C, mientras que la otra se almacenó a 40 °C. Después de 28 días, las muestras fueron analizadas por LC-UV. La estabilidad química se calculó como % de pérdida utilizando las siguientes ecuaciones:

– Estabilidad química (como % de pérdida) = [(pureza después de 28 días a 5 °C) - (pureza después de 28 días a 40 °C)] x 100/(pureza después de 28 días a 5 °C)

– % de pureza = [(área del pico del compuesto) x 100/(área del pico total)]

Los datos representativos de la solubilidad del tampón se proporcionan en la **Tabla 22** a continuación:

Tabla 22

Id. de sec.	pH	Solubilidad (mg/ml)
187	7,4	8,8
	4,5	8,2
188	7,4	7,9
	4,5	8,3
189	7,4	6,3
	4,5	9,0

Id. de sec.	pH	Solubilidad (mg/ml)
190	7,4	8,5
	4,5	8,5
191	7,4	9,0
	4,5	8,5
192	7,4	7,9
	4,5	8,4
193	7,4	0,1
	4,5	8,6
194	7,4	0,7
	4,5	7,3

Se proporcionan datos representativos de la estabilidad química en la **Tabla 23** a continuación:

Tabla 23

Id. de sec.	pH	% pérdida
187	7,4	31
	4,5	0
188	7,4	40
	4,5	0
189	7,4	48
	4,5	0
190	7,4	35
	4,5	0
191	7,4	54
	4,5	0
192	7,4	49
	4,5	0

5 Todas las secuencias divulgadas en la presente memoria se enumeran en la lista de secuencias adjunta, cuyo contenido completo forma parte de esta memoria descriptiva.

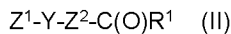
10 Además, los materiales, métodos y ejemplos proporcionados son solo ilustrativos y no pretenden ser limitantes. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que comúnmente entiende un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Debe entenderse que si bien la divulgación se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior pretende ilustrar y no limitar el alcance de la invención, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones.

15

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto que es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I):
 X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19-X20- X21 - X22- X23- X24-
 X25- X26- X27 - X28- X29- X30- X31 - X32 - X33- X34- X35-X36-X37-X38 (I) en donde

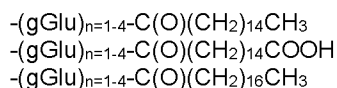
X1 es isoleucina (I) o fenilalanina (F);
 X2 es valina (V) o treonina (T);
 X3 es leucina (L);
 X4 es serina (S);
 X5 es leucina (L);
 X6 es aspartato (D);
 X7 es valina (V) o D-valina (v);
 X8 es prolina (P);
 X9 es isoleucina (I) o treonina (T);
 X10 es lisina (K), glutamato (E), histidina (H) o glicina (G);
 X11 es isoleucina (I) o leucina (L);
 X12 es lisina (K), en donde el grupo épsilon-amino de la cadena lateral de lisina está unido covalentemente a una fracción de unión a albúmina
 X13 es glutamina (Q) o lisina (K);
 X14 es isoleucina (I), lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
 X15 es leucina (L);
 X16 es leucina (L) o fenilalanina (F);
 X17 es glutamato (E) o lisina (K);
 X18 es glutamina (Q);
 X19 es alanina (A), glutamato (E) o glutamina (Q);
 X20 es lisina (K) o arginina (R);
 X21 es glutamina (Q) o lisina (K);
 X22 es lisina (K), arginina (R) o glutamato (E);
 X23 es lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
 X24 es glutamina (Q), ácido 2-aminoisobutírico (Aib), leucina (L) o glutamato (E);
 X25 es arginina (R), lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
 X26 es alanina (A), glutamato (E), ácido 2-aminoisobutírico (Aib) o glutamina (Q);
 X27 es glutamina (Q), ácido 2-aminoisobutírico (Aib) o lisina (K);
 X28 es alanina (A);
 X29 es glutamato (E) o lisina (K);
 X30 es lisina (K) o treonina (T);
 X31 es asparagina (N) o alanina (A);
 X32 es lisina (K), alanina (A), valina (V), treonina (T), glutamato (E) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
 X33 es arginina (R), lisina (K) o glutamina (Q);
 X34 es isoleucina (I) o leucina (L);
 X35 es leucina (L);
 X36 es alanina (A) o glutamato (E);
 X37 es glutamina (Q) o arginina (R); y
 X38 es isoleucina (I) o valina (V);
 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; en donde la fracción de unión a albúmina es un grupo de Fórmula (II):



en donde,

Y es AEEA, {AEEA}₂, {AEEA}₃, Gly, {Gly}₂, {Gly}₃, N-MeGly, {N-MeGly}₂, {N-MeGly}₃ o está ausente cuando Z² es gGlu, o {gGlu}₂, en donde AEEA denota [2-(2-aminoetoxi)etoxi]-acetilo;
 Z¹ y Z² cada uno de ellos se selecciona independientemente de gGlu, {gGlu}₂, {gGlu}₃, {gGlu}₄ o están ausentes, en donde Z¹ está ausente cuando Y es {AEEA}₂ y Z² es gGlu o {gGlu}₂; y
 R¹ es -(CH₂)_xCOOH o -(CH₂)_xCH₃, en donde x es un número entero de 12 a 22.

2. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:



- 5
 10
 15
- (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
 - (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈CH₃
 - (gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH
 - (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄CH₃
 - (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
 - (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆CH₃
 - (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
 - (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈CH₃
 - (AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH
 - (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄CH₃
 - (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₄COOH
 - (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆CH₃
 - (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₆COOH
 - (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈CH₃; y
 - (gGlu)_{n=1-4}-(AEEA)_{n=1,2}-(gGlu)_{n=1-4}-C(O)(CH₂)₁₈COOH.

3. El compuesto de las reivindicaciones 1 o 2, en donde:

- 20
 25
 30
 35
 40
 45
- X1 es isoleucina (I);
 - X2 es valina (V);
 - X7 es valina (V) o D-valina (v)
 - X9 es isoleucina (I) o treonina (T);
 - X10 es lisina (K) o glicina (G);
 - X11 es leucina (L);
 - X13 es lisina (K) o glutamina (Q);
 - X14 es lisina (K) o isoleucina (I);
 - X16 es leucina (L);
 - X19 es alanina (A) o glutamato (E);
 - X21 es glutamina (Q);
 - X22 es glutamato (E), arginina (R) o lisina (K);
 - X23 es lisina (K) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
 - X24 es glutamato (E) o glutamina (Q) o ácido 2-aminoisobutírico (Aib);
 - X25 es lisina (K) o arginina (R);
 - X26 es alanina (A), glutamato (E) o glutamina (Q);
 - X27 es ácido 2-aminoisobutírico (Aib); lisina (K) o glutamina (Q);
 - X29 es glutamato (E);
 - X30 es lisina (K) o treonina (T);
 - X31 es asparagina (N);
 - X32 es lisina (K) o alanina (A);
 - X33 es arginina (R) o glutamina (Q)
 - X34 es isoleucina (I);
 - X35 es leucina (L);
 - X36 es alanina (A) o glutamato (E);
 - X37 es arginina (R) o glutamina (Q); y
 - X38 es valina (V).

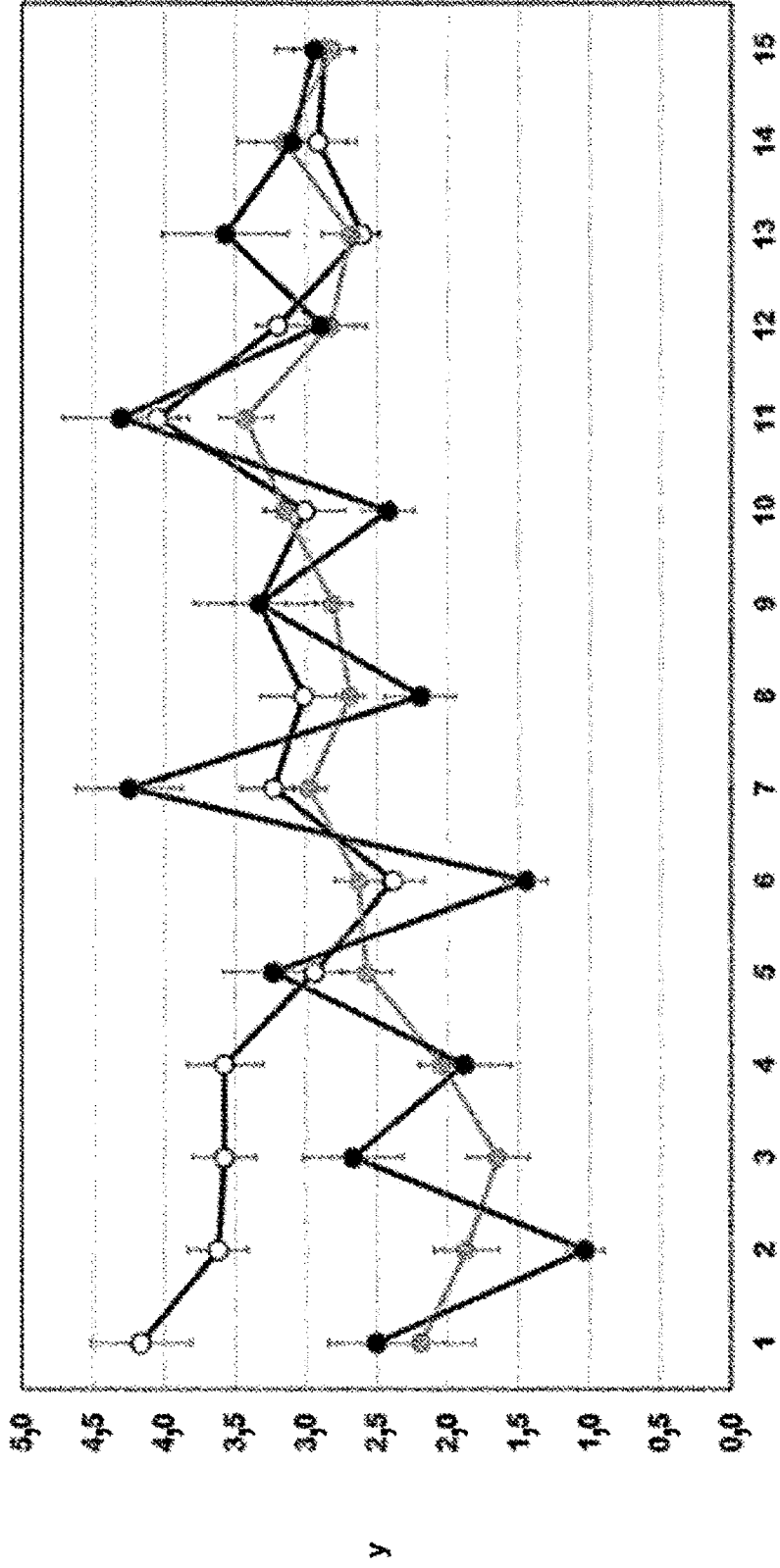
4. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

- 50
 55
 60
- X7 es D-valina (v);
 - X10 es lisina (K) o glicina (G);
 - X19 es alanina (A) o glutamato (E);
 - X34 es ácido 2-aminoisobutírico (Aib) o lisina (K);
 - X24 es ácido 2-aminoisobutírico (Aib) o glutamina (Q);
 - X25 es arginina (R);
 - X26 es glutamina (Q), alanina (A) o glutamato (E);
 - X27 es glutamina (Q) o lisina (K);
 - X30 es treonina (T) o lisina (K);
 - X33 es arginina (R) o glutamina (Q);
 - X36 es alanina (A) o glutamato (E); y
 - X37 es arginina (R) o glutamina (Q).

5. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde:

- 65
- X10 es lisina;
 - X19 es glutamato (E);
 - X24 es glutamina (Q);

- 5 X25 es arginina (R);
 X26 es glutamato (E);
 X27 es glutamina (Q).
 X30 es lisina (K);
 X33 es glutamina (Q);
 X36 es alanina (A); y
 X37 es glutamina (Q).
- 10 6. El compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el compuesto es un péptido de la secuencia de aminoácidos de Fórmula (I), opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X1 está acetilado y opcionalmente en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 15 7. El compuesto de la reivindicación 6, en donde el residuo de aminoácido en X38 está amidado como una amida primaria C-terminal.
8. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la fracción de unión a albúmina se selecciona de los siguientes grupos:
- 20 $-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
 $-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
 $-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
 $-(\text{AEEA})_{n=1,2}-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
 $-(\text{AEEA})_{n=1,2}-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
 25 $-(\text{AEEA})_{n=1,2}-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
 $-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{AEEA})_{n=1,2}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
 $-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{AEEA})_{n=1,2}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
 $-(\text{gGlu})_{n=1-4}-\text{C}(\text{O})(\text{AEEA})_{n=1,2}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
- 30 9. El compuesto de la reivindicación 1, en donde la fracción de unión a albúmina es $-\{\text{AEEA}\}_2-\text{gGlu}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$; o $-\{\text{AEEA}\}_2-\text{gGlu}-\text{C}(\text{O})(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$.
10. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es un péptido de una cualquiera de las id. de sec. n.º 1 a 227 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 35 11. El compuesto de la reivindicación 1, en donde el compuesto es un péptido de una cualquiera de las id. de sec. n.º 3, 7, 35, 83, 130, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 147, 149, 151, 152, 171, 172, 173 y 174 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
- 40 12. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
13. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en terapia.
- 45 14. Un compuesto de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 o una composición farmacéutica de la reivindicación 12, para su uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad cardiovascular, obesidad o diabetes en un paciente.



x

Figura 1

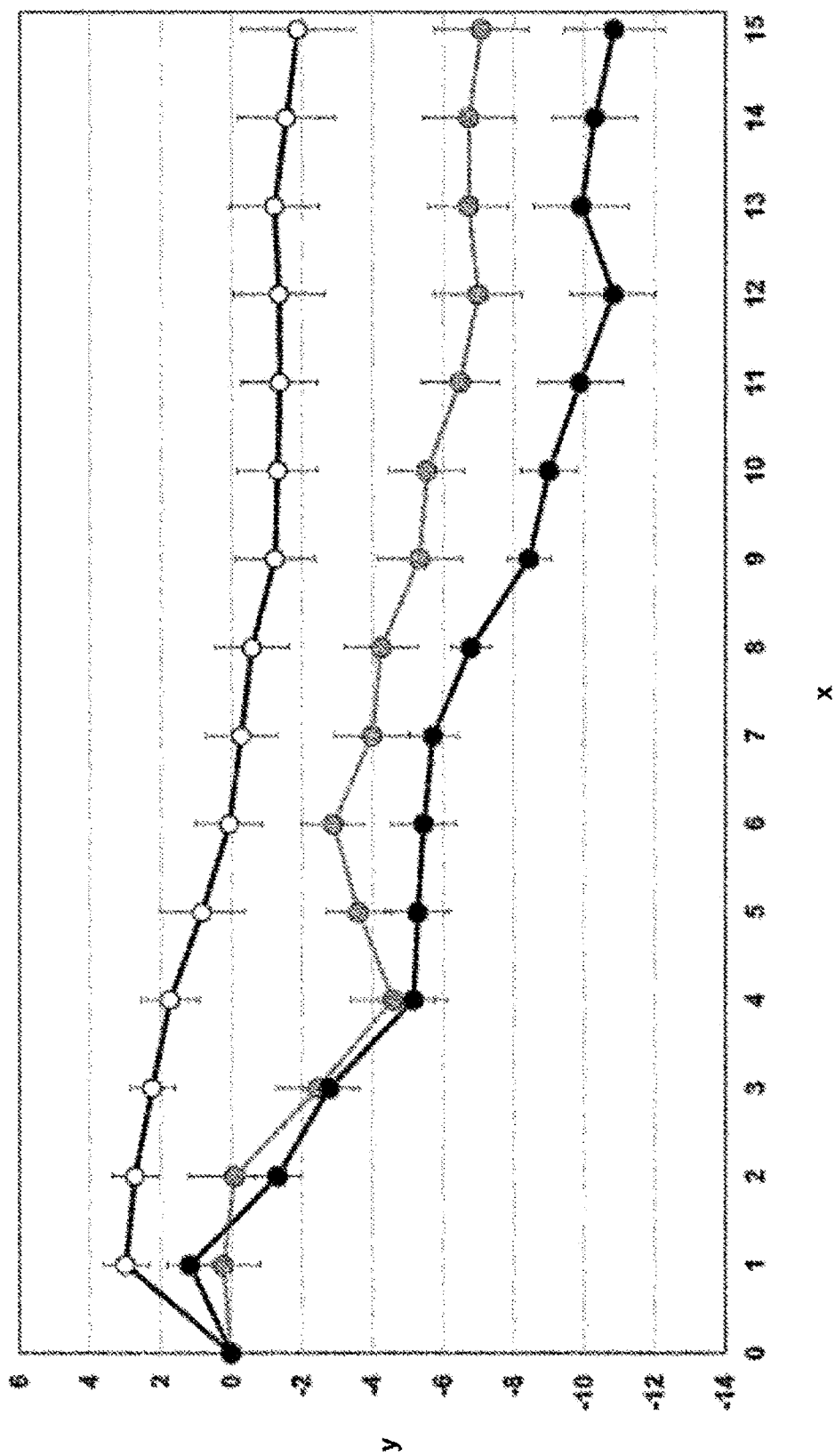


Figura 2

Sec. de peptido	N.º de saccharin de patente	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	130	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L
	171												K[sema]
	172												K[(AEEA)2-(Glu)2-C18OH]
	173												K[(AEEA)2-(Glu)2-C20OH]
2	83	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	G	L
	135	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L
	136	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L
	137	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L
	138	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L
	139	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L
	147	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	G	L
	151	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	G	L
	174	H2N	I	V	L	S	L	D	dv	P	I	K	L

Sec. de peptido	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	GERS		GERS		
																											Form	Conte		Form	Conte
1	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	Q	R	E	Q	A	E	K	N	K	Q	I	L	A	Q	V	NH2	0,05	101,19	NoVal	20,3
																												0,17	94,07	NoVal	7,54
																												0,04	82,88	NoVal	25,56
																												0,03	100,54	NoVal	73,3
	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	R	E	Q	A	E	T	N	K	R	I	L	E	R	V	NH2	0,07	100,75	NoVal	7,51	
	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	Q	R	Q	A	E	K	N	K	Q	I	L	A	Q	V	NH2	0,04	101,13	NoVal	28,4	
	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	R	Q	Q	A	E	K	N	K	Q	I	L	A	Q	V	NH2	0,05	100,47	NoVal	23,75	
	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	Q	R	E	Q	A	E	K	N	K	Q	I	L	E	Q	V	NH2	0,04	100,95	NoVal	22,5
	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	Q	R	Q	A	E	K	N	K	Q	I	L	A	Q	V	NH2	0,06	100,02	NoVal	4,38	
	Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	R	E	Q	A	E	T	N	K	Q	I	L	A	Q	V	NH2	0,03	101,13	NoVal	37,61	
Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	R	E	Q	A	E	T	N	K	R	I	L	E	R	V	NH2	0,18	97,98	NoVal	4,54		
Q	I	L	L	K	Q	E	R	Q	K	Alb	R	E	Q	A	E	K	N	K	R	I	L	E	R	V	NH2	0,08	102,79	NoVal	9,07		
Q	I	L	L	K	Q	A	R	Q	K	Alb	Q	R	A	Q	A	E	K	N	K	R	I	L	E	R	V	NH2	0,07	101,19	NoVal	91	42,05

Figura 3